

Aus dem Institut für Anatomie der Universität Regensburg

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. med. vet. et Dr. rer. nat. K.-H. Wrobel

vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. B. Vollmerhaus
Vorstand des Instituts für Tieranatomie
der Universität München

HISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN
AN KEIMDRÜSENEXPLANTATEN
DES MÄNNLICHEN HAUSRINDES
IM GEWEBEKULTURVERSUCH

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Hans Weigl
aus
Mantel in der Oberpfalz

München 1986





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Anatomie der Universität Regensburg

Arbeit angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. med. vet. et Dr. rer. nat. K.-H. Wrobel

vorgelegt über
Prof. Dr. med. vet. B. Vollmerhaus
Vorstand des Instituts für Tieranatomie
der Universität München

HISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN KEIMDRÜSENEXPLANTATEN DES MÄNNLICHEN HAUSRINDES IM GEWEBEKULTURVERSUCH

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Hans Weigl

aus

Mantel in der Oberpfalz

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Zucker
Referent:	Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. D. Stavrou

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
1. Testikuläres Gewebe des Hausrindes als Grundlage für Kulturversuche	1
2. Zur Hodenmorphologie des Bullen	3
II. Material und Methoden	7
1. Material	7
2. Präparation	7
3. Räumliche Voraussetzungen für die Durchführung der Gewebekultur und technische Ausstattung ..	9
4. Vorbereitende Maßnahmen	11
5. Nährmedien	11
6. Durchführung der Kulturversuche	16
7. Histochemische Untersuchungen	21
III. Ergebnisse	23
IV. Diskussion	57
V. Zusammenfassung und Summary	69
VI. Abbildungen	73
VII. Literaturverzeichnis	108

Lebenslauf

I. EINLEITUNG

1. Testikuläres Gewebe des Hausrindes als Grundlage für Kulturversuche

Der Rinderhoden eignet sich aufgrund einer Reihe von Eigenschaften besonders gut als Modellorgan im Rahmen vergleichender anatomischer Untersuchungen, die auch die Situation beim Menschen einbeziehen.

Dieser Sachverhalt wird durch die Ergebnisse FAWCETT's et al. (1973) verdeutlicht, die zu einer, von der Entwicklungsgeschichte unabhängigen Spezieseinteilung führten, welche auf der Organisationsform des interstitiellen Hodengewebes basiert:

- a) Arten mit relativ geringem Volumenanteil der Leydigzellen (1 - 5 % des Hodenvolumens) und einem Minimum an interstitiellem Bindegewebe, wobei der überwiegende Anteil des intertubulären Areals von Lymphsinusoiden gebildet wird, die um die Tubuli angeordnet sind und eine kontinuierliche bzw. diskontinuierliche Endothelauskleidung aufweisen.

Diese Gruppe umfaßt unter anderem das Chinchilla, die Ratte und die Maus.

- b) Spezies, bei welchen Leydigzellgruppen in sehr lockerem Bindegewebsstroma weit verstreut liegen, wobei das Interstitium von mehr oder weniger zentral gelegenen Lymphgefäßen drainiert wird.

Hierzu gehören Widder, Bulle, Klippschliefer, Elefant, Affe und Mensch.

- c) Tiere, bei denen dicht gelagerte epitheloide Leydigzellen den dominierenden Anteil am Interstitium (20 - 60 % des Hodenvolumens) darstellen. Die übrigen Bestand-

teile treten stark zurück. Lymphgefäße existieren nur in geringer Anzahl und sind relativ klein.

In diese Kategorie sind das Hausschwein, das Warzenschwein, das Zebra, das Opossum und die nackte Maulwurfratte zu zählen.

Zwar existieren auch beim Rinderhoden in einigen Bereichen der Morphologie und der Topographie artspezifische Besonderheiten (WROBEL 1979, WROBEL et al. 1981 und 1982), trotzdem lassen sich die anatomischen und physiologischen Verhältnisse weitgehend mit den übrigen Spezies der zweiten Kategorie nach FAWCETT (1973) vergleichen. Dies gilt auch in wesentlichen Bereichen der hormonellen Regulations- und Kopplungsmechanismen.

Deshalb wurde der Rinderhoden bereits für eine Anzahl fortpflanzungsbiologischer Fragestellungen untersucht. Anlaß für die Durchführung der Experimente zur vorliegenden Arbeit war zum einen die Überlegung, ob und in welcher Richtung sich Hodengewebe entwickelt, das von den Regulationsebenen Hypophysenvorderlappen und Hypothalamus abgekoppelt ist, also allenfalls von Interaktionen der organspezifischen Kompartimente beeinflusst wird. Zum anderen sollten Erfahrungen in Bezug auf Arbeitsmethodik (Probenentnahme, Präparation, Kulturtechnik) gesammelt werden, die in Verbindung mit der Feststellung gesetzmäßig auftretender Abläufe in Relation zur Versuchsdauer eine Standardisierung des methodischen Vorgehens ermöglichen, um in einer sich anschließenden Phase dann schrittweise für detaillierte Fragestellungen wichtig erscheinende Parameter (z. B. Hormone) zu substituieren.

Ein weiterer Aspekt betraf die Fragestellung, ob sich eine Gewebekultur auf der Grundlage von Hodenmaterial des Hausrindes grundsätzlich zur Untersuchung der aufgezeigten Problematik verwenden läßt, um die nicht nur materiell äußerst

aufwendige Verwendung von Versuchstieren zu vermeiden, sondern auch aus Gründen des Tierschutzes nach Möglichkeit zu erübrigen.

2. Zur Hodenmorphologie des Bullen

Beim Rind ist der Hodenabstieg bereits bei einer Scheitel-Steiß-Länge des Fetus von 31,5 cm beendet, dies entspricht der 19. bis 20. Woche der Gravidität bei einer mittleren Dauer der Trächtigkeit von 285 Tagen bei der Rasse Deutsches Fleckvieh (MICHEL 1976).

Im Gegensatz zu seiner wilden Stammform *Bos taurus primigenius* (Ur- oder Auerochse) für die in Analogie zu den übrigen Wildwiederkäuern der gemäßigten Breiten eine Saisonalität der Fortpflanzung postuliert wird (VON LENDERKEN 1955, HEPTNER und NAUMOV 1966), ist das Hausrind in seiner Fortpflanzung asaisonal und polyöstrisch. Dieser Sachverhalt ist für die Anlage von Gewebekulturen insofern von Wichtigkeit, als die mit der Asaisonalität einhergehende ganzjährige Paarungsbereitschaft des Bullen demzufolge stets voll funktionsfähiges Hodengewebe erwarten läßt, d. h. Kulturversuche mit diesem Organ sind unabhängig von der Jahreszeit durchführbar.

Die Lage der Hoden im Skrotum außerhalb der Bauchhöhle mit dem Caput epididymidis proximal zur Regio inguinalis weicht von der Situation bei anderen Haustieren, wie Pferd, Hund und Schwein ab.

Als Mindestwerte für voll funktionsfähige Testes gibt ROSENBERGER (1978) für Bullen der Rasse Deutsche Schwarzbunte folgende Werte an:



Alter (Jahre)	Umfang	Länge m. Nebenh.
1 - 1 1/2	30 cm	8,5 cm
1 1/2 - 2	32 cm	9,0 cm

Die Geschlechtsreife tritt in Abhängigkeit von Rasse und Fütterung im Alter von 6 - 10 Monaten ein (KÜST und SCHÄTZ 1977), die Zuchtreife zwischen 12 - 18 Monaten, wobei abnehmendes Tageslicht diesen Vorgang positiv stimuliert.

Bei einer zumutbaren Geschlechtsbeanspruchung von 2 - 4 mal wöchentlich und einer Spermatogenesedauer von 60 Tagen, wobei die Länge des Keimepithelzyklus mit 13 Tagen und die Zeit von Praeileptotän bis zum Auftreten von Spermien im Tubulus mit 40 Tagen anzunehmen ist (LEIDL 1980), beträgt die tägliche Spermienproduktion 11×10^9 , pro Gramm Hodengewebe 17×10^6 (AMANN und ALMQUVIST 1962).

In morphologischer Hinsicht ist erwähnenswert, daß beim Rind die Membrana propria eine charakteristische Schichtung aus 3 - 5 Lagen flacher, peritubulärer Zellen aufweist, die als Myofibroblasten in Erscheinung treten (WROBEL et al. 1979). Charakteristisch sind knopfartige Verdickungen im Bereich der eigentlichen Tubuli seminiferi. Adluminal der Basallamina folgen die Sertolizellen, beim Rind mit einem besonders komplex ausgeprägten Nucleolus und einem außergewöhnlich hohen Gehalt an glattem endoplasmatischen Retikulum (WROBEL und SINOWATZ 1982).

In Analogie zu anderen Spezies bilden sehr feste Verbindungen benachbarter Sertolizellen eine Diffusionsbarriere zum Tubuluslumen (Blut-Hoden-Schranke), wobei Spermatogonien

und proleptotäne Spermatozyten diesseits (peripher), die fortgeschrittenen proliferativen Zellformen und Stadien der Spermiogenese (Differenzierung) jenseits (adluminal) dieser Struktur lokalisiert sind. Auf die Keimzelldifferenzierung beim Rind im einzelnen soll hier nicht näher eingegangen werden, da hierzu detaillierte Angaben bei LENGFELDER (1978) und SINOWATZ et al. (1982) zu finden sind. Als Besonderheit dieses Vorganges beim Rind und einigen verwandten Arten, z. B. Schaf, sei jedoch eine charakteristische Verschiebung des Histonprofils während der Spermiogenese von lysin- zu argininreich erwähnt. Während der Reifungsphase erfolgt ein Ersatz durch basische Nüchthistonproteine. Die Kondensation des Kerns beim Übergang von der rundkernigen Spermatoide zum definitiven Spermium ist beim Rind nicht vom Verschwinden der Histone abhängig (SCHEUBECK 1984).

Auch im Interstitium weist der Rinderhoden einige Besonderheiten auf. So besitzen die Leydigzellen Mitochondrien, sowohl vom Tubulus- als auch vom Cristaetyp, die häufig auch kristalloide Einschlüsse zeigen (WROBEL et al. 1981). Im Gegensatz zu anderen Spezies grenzt nicht jede endokrin aktive Leydigzelle an eine Blut- oder Lymphkapillare. Zwischen den Leydigzellen einer Gruppe sind jedoch Gap Junctions sowie interzelluläre Canaliculi ausgebildet, die einen Androgentransport ermöglichen (WROBEL et al. 1981).

Eine weitere Besonderheit im Interstitium stellen Light intercalated cells (LIC) dar. Bei dieser Fraktion handelt es sich eventuell um Monozytenderivate, die an der Testostéronspeicherung und -verteilung partizipieren können (WROBEL et al. 1981). Charakteristisch für diese unregelmäßig geformten Zellen mit langen Fortsätzen ist der geringe Gehalt an Mitochondrien und Lysosomen und ein schwach entwickeltes endoplasmatisches Retikulum (WROBEL et al. 1981).

Hinsichtlich der Lymphgefäßversorgung ist das Fehlen peritubulärer Lymphsinusoide festzuhalten. Die vorhandenen Lymphgefäße liegen zentral im Interstitium. Schmale Fortsätze ermöglichen eine Kommunikation benachbarter Gefäße und bilden dadurch eine vernetzte Struktur.

Die Blutkapillaren verlaufen vorzugsweise in enger Nachbarschaft zur Membrana propria der Tubuli (WROBEL et al. 1981).

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

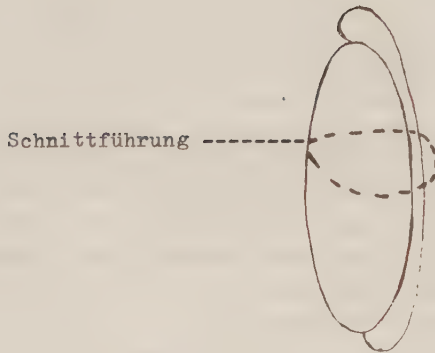
Die Materialauswahl erfolgte aus einem Kollektiv an Jungbullen der Rasse Deutsches Fleckvieh, die am städtischen Schlachthof Regensburg angeliefert wurden. Selektionskriterien waren neben einem ungestörten Allgemeinbefinden die Zugehörigkeit zu einer einheitlichen Altersgruppe von 16 bis 18 Monaten, Symmetrie beider Hoden und Maße entsprechend angeführter Tabelle.

Die Entnahme der Hoden erfolgte unmittelbar im Anschluß an die Schlachtung jeweils einschließlich der Nebenhoden und des Funiculus spermaticus, wobei streng darauf geachtet wurde, daß die Hodenumhüllung durch die Tunica vaginalis vollständig erhalten blieb, um jegliche Verunreinigung des Probenmaterials zu vermeiden.

Die derart gewonnen Organe wurden anschließend in einem isolierten Transportbehälter mit Deckel aus geschäumtem Kautschuk (Größe 25 x 20 cm) deponiert und in kleinkörnige Eiswürfel eingebettet. Anschließend erfolgte der Transport zum Institut für Anatomie der Universität Regensburg, wobei das maximale Intervall zwischen Organentnahme und Beginn der Präparation 15 Minuten betrug.

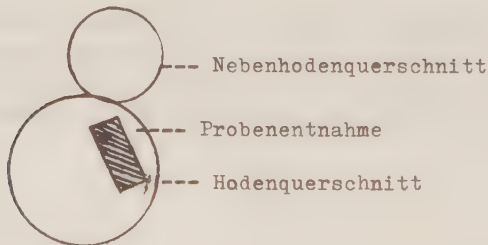
2. Präparation

Unter sterilen Kautelen wurde der nunmehr von der Tunica vaginalis befreite Hoden in eine nierenförmige Präparierschale überführt. Hier erfolgte eine Durchtrennung des Gewebes quer zur Längsachse mittels Einwegskalpell.



Auf der so entstandenen Schnittfläche wurden Quader im Ausmaß $5 \times 5 \times 15$ mm auf halber Distanz zwischen Zentrum und peripherem Bereich entnommen.

Obwohl die Untersuchungen von DOSTAL (1986) zeigten, daß hinsichtlich der Verteilung intertubulärer Areale kein signifikanter Unterschied zwischen peripheren und zentral-gelegenen Hodenabschnitten besteht, wurde im Hinblick auf eine Standardisierung der Methodik auf die Beibehaltung der Entnahmestelle geachtet.



Diese Ausschnitte wurden sofort zur weiteren Präparation in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) - mit Nährmedium gefüllt und auf 32 ° Celsius temperiert - verbraucht.

Hier wurden mit Hilfe einer Iridektomieschere (Fa. ÄSCULAP, Tuttlingen) sowie einer Irispinzette (ÄSCULAP Nr. 26R) Würfel von 1 mm Kantenlänge abgetrennt und auf Edelstahl-grids (titanlegiert) - passend zu Zellgewebeskulturschalen FALCONTM (USA, Organ tissue culture dish Nr. 3037, 60 x 15 mm, with center well) - deponiert. Auf ein Grid wurden jeweils 5 Proben mit 1 mm³ aufgelegt. Pro Kulturversuch wurden 150 Würfel angefertigt und auf 30 FALCONTM-Schalen verteilt.

3. Räumliche Voraussetzungen für die Durchführung der Gewebekultur und technische Ausstattung

Da schon eine minimale Kontamination z. B. mit in der Raumluft vorhandenen ubiquitären Keimen sehr leicht den Erfolg eines Kulturversuches in Frage stellt, wird in den Standardwerken zur Zell- und Gewebezüchtung (HALLE 1976, MAYR et al. 1976) als wichtigste Voraussetzung zur Durchführung einer Kulturreihe die Einrichtung eines sterilen Arbeitsraumes mit vorgeschalteter Personenschleuse gefordert.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuchsserien stand ein 18 m² großer Raum zur Verfügung. Das Betreten ist nur nach Passieren einer 6 m²-großen Schleuse möglich. Auf der Innenseite der Eingangstüre zu diesem Vorraum wurde zusätzlich ein Wannenbad zur Schuhdesinfektion eingebaut (Maße 60 x 40 x 10 cm, gefüllt mit 4 %iger Lösung MUCOCIT^R - Fa. Merz u. Co Frankfurt/M. - chlor- und ätzalkalifrei).

Ferner besteht im Schleusenraum die Möglichkeit zum Anlegen von Schutzkleidung. Die Bediensalter für die Beleuchtungseinrichtung des Arbeitsraumes (Neonlicht während der Betriebszeit, UV-Licht mit zusätzlichem keimhemmendem Effekt außerhalb des Aufenthalts von Personen) sowie eine Halterung zur Aufnahme der für den Betrieb der Brutschränke notwendigen CO₂-Stahlflasche mit Druckmanometer befindet sich ebenfalls im Vorraum. Der Überleitungsschlauch der CO₂-Zuführung ist durch eine Bohrung des Türrahmens des Kulturraumes gelegt und seitlich abgedichtet.

Alle vorhandenen Oberflächen sind desinfizierbar. Der Boden ist mit Keramikplatten versehen. Alle übrigen Einrichtungsgegenstände sind kunststoffbeschichtet oder aus Edelstahl. Zum Inventar gehören zwei Kulturschränke ASSAB 303GF. CO₂-Zufuhr und Temperatur sowie die Luftfeuchtigkeit sind stufenlos einstellbar.

Die Durchführung der anfallenden Präparations- und Entnahmearbeiten erfolgte auf einer sterilen Arbeitsbank Modell ASSAB mit Laminar Flow. Außerhalb der Betriebszeit wurde diese Anlage mit minimalem Luftdurchfluß und UV-Beleuchtung, sonst mit maximaler Strömungsgeschwindigkeit und Neonlicht gefahren. Vor Inbetriebnahme erfolgte ein Luftfilterwechsel.

Als weitere Einrichtungsgegenstände des Kulturraumes sind Kalt- und Warmwasserzuführung mit Stahlspülbecken, ein wandbefestigter Geräteschrank mit Schiebetüren sowie eine Arbeitsplatte mit einem Stereo- und Lichtmikroskop LEITZ zu nennen. Um unnötiges Betreten des Raumes zu vermeiden ist für einen separaten Telefonanschluß gesorgt.

4. Vorbereitende Maßnahmen

Vor Beginn der Versuchsreihen wurde der Kulturraum inklusive der Schleuse mehrmals einer intensiven Reinigung unterzogen, anschließend dreifach desinfiziert - einschließlich aller Geräte und Einrichtungsgegenstände - und anschließend in 1-stündigem Abstand mit Propanol (70 %) eingedampft. Als Desinfektionsmittel für den Bodenbelag gelangte MUCOCIT^R in 4 %iger Lösung zur Anwendung.

Alle Kunststoff-, Metall- und Glaseinrichtungsgegenstände und -oberflächen wurden dreimal mit Propanol gereinigt.

Aqua bidest. wurde autoklaviert in Schraubverschlußbehältern unter Flow aufbewahrt, ebenso Kunststoffspitzen für EPPENDORF-Pipetten. An sterilen Einmalartikeln wurden ferner OP-Handschuhe, Einmalpipetten (10 ml) und Pasteurpipetten bereitgestellt.

Als Unterlagen für die FALCONTM-Kulturschalen wurden Styroporplatten (250 x 150 x 30 mm) verwendet, die vor Gebrauch ebenfalls einer Dreifachdesinfektion mit Propanol (70 %) unterzogen wurden.

5. Nährmedien

Bei den nachfolgend beschriebenen Gewebekulturversuchen gelangten zwei unterschiedlich zusammengesetzte Nährmedien - Minimal Essential Medium (MEM) und Medium 199 - zur Anwendung, um für spätere Untersuchungen Erfahrungswerte im Hinblick auf eine optimierte Bedarfsdeckung der spezifischen Ansprüche der Gewebeproben zu sammeln. Bei beiden Zubereitungen wurde die Variation mit EARLE'S Salzen verwendet (MEM außerdem mit SPINNER'S und HANKS'Salzen, M 199 zusätzlich mit HANKS' lieferbar).

a) Medium 199

Diese Zubereitung zählt zur Gruppe der synthetischen Nährmedien und wurde von der Gruppe um J. F. Morgan und R. C. Parker bereits 1950 entwickelt. Wie nachfolgende Tabelle zeigt, ist die Zusammensetzung relativ komplex (61 Substanzen). Die von uns verwendete Zubereitung enthält 2,2 g/l NaHCO_3 als Puffer.

b) Minimal Essential Medium (MEM)

Es zählt ebenfalls zu den synthetischen Nährmedien. Entwickelt von H. EAGLE im Jahre 1959 (deshalb häufig auch als EAGLE-MEM bezeichnet), als durch die Anwendung der automatischen Aminosäurenanalyse an Nährmedien essentielle Aminosäuren isoliert werden konnten, enthält es im Vergleich zum erstbeschriebenen M 199 nur 29 Substanzen, ist also wesentlich weniger umfangreich zusammengesetzt. Das hier eingesetzte MEM enthält 0,85g/l NaHCO_3 als Puffersubstanz.

Beide Medien wurden von der Firma BIOCHROM KG, D-1000 Berlin 46 (SEROMED^R) bezogen. M 199 Katalog-Nr. F 0615, Ch.B OG08. MEM Katalog-Nr. F 0315, Ch.B OG39.

Die Lagerung erfolgte bei +4 ° Celsius im Kühlschrank des Kulturraumes. Eine Stunde vor der jeweiligen Verwendung (Kulturstart bzw. Medienwechsel) wurden je 100 ml im Kühlschrank auf 32 ° Celsius erwärmt (gleiche Temperatur wie bei Kulturbetrieb). Als Infektionsprophylaxe erfolgte die Zugabe von Penicillin-Streptomycin (BOEHRINGER^R) in einer Konzentration von 100 µg/ml Medium, sowie von Nystatin (MYCOSTATIN^R, Fa. SERVA, Nr. 29870) in einer Dosis von 5 µg/ml Medium.

Die ursprünglich rosarote Farbtonung (pH alkalisch) des Indikators der Medien ändert sich nach Beginn der CO_2 -Zufuhr und erfolgter Einstellung des Puffers in farblos (pH sauer).

Unterbrechungen der CO_2 -Begasung bedingen eine erneute Rotfärbung. Dadurch ist eine adspektorische Kontrolle des pH-Wertes möglich. Zusätzlich erfolgte nach dem Kulturstart täglich eine pH-Messung mittels pH-Meter. Das Gerät wurde jeweils vor Gebrauch geeicht. Die Digitalanzeige ermöglicht eine Ablesegenauigkeit von 1/100.

MEDIUM 199 Mediumzusammensetzung (Mengen in mg/l)

	EARLE's Salze
NaCl	6800
KCl	400
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	-
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140
KH ₂ PO ₄	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200
CaCl ₂	200
D-Glucose	1000
Phenolrot	17 *
NaHCO ₃	2200

* Indikatorzusatz je nach Rezeptur in unterschiedlicher Konzentration (Herstellerangabe)

DL-Alanin	50	Thymin	0,3
L-Arginin HCl	70	Uracil	0,3
DL-Asparaginsäure	60	Xanthin	0,3
L-Cystein HCl	0,1		
L-Cystin	20	ATP, Na ₂	1
L-Glutamin	100	AMP	0,2
DL Glutaminsäure H ₂ O	150	Ascorbinsäure	0,05
Glycin	50	Biotin	0,01
L-Histidin HCl	20	Calciferol	0,1
L-Hydroxyprolin	10	D-Ca-Pantothenat	0,01
DL-Isoleucin	40	Cholinchlorid	0,5
DL-Leucin	120	Folsäure	0,01
L-Lysin HCl	70	i-Inosit	0,05
DL-Methionin	30	Menadion	0,01
DL-Phenylalanin	50	Nicotinsäure	0,025
L-Prolin	40	Nicotinsäureamid	0,025
DL-Serin	50	p-Aminobenzoesäure	0,05
DL-Threonin	60	Pyridoxal HCl	0,025
DL-Tryptophan	20	Pyridoxin HCl	0,025
L-Tyrosin	40	Riboflavin	0,01
DL-Valin	50	Thiamin HCl	0,01
Glutathion	0,5	DL-α-Tocopherolphosphat Na ₂	0,01
Natriumacetat	50	Vitamin A	0,1
Fe(NO ₃) ₃	0,1	Cholesterin	0,2
Tween 80*	20	2-Desoxy-D-Ribose	0,5
		D-Ribose	0,5
Adeninsulfat	10		
Guanin HCl	0,3		
Hypoxanthin	0,3		

* Warenzeichen der ATLAS CHEMIE

MEM – Mediumzusammensetzung (Mengen in mg/l)

	EARLE's Salze
NaCl	6800
KCl	400
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	–
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	140
KH ₂ PO ₄	–
MgSO ₄ · 7H ₂ O	200
CaCl ₂	200
D-Glucose	1000
Phenolrot	10*
NaHCO ₃	2200

*Indikatorzusatz je nach Rezeptur in unterschiedlicher
Konzentration (Herstellerangabe)

L-Arginin HCl	126
L-Cystin	24
L-Glutamin	292
L-Histidin HCl · H ₂ O	42
L-Isoleucin	52
L-Leucin	52
L-Lysin HCl	73
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	32
L-Threonin	48
L-Tryptophan	10
L-Tyrosin	36
L-Valin	46

D-Ca-Pantothenat	1
Pyridoxal HCl	1
Thiamin HCl	1
Riboflavin	0,1
i-Inosit	2

MEM nicht-essentielle Aminosäuren
(100 x)

	mg/l
L-Alanin	890
L-Asparagin · H ₂ O	1500
L-Asparaginsäure	1330
L-Glutaminsäure	1470
Glycin	750
L-Prolin	1150
L-Serin	1050

Folsäure	1
Cholinchlorid	1
Nicotinsäureamid	1

6. Durchführung der Kulturversuche

Die nachfolgend beschriebenen Arbeitsmaßnahmen erfolgten auf der sterilen Arbeitsbank ASSAB bei maximaler Einstellung der Flowgeschwindigkeit.

Um ein zügiges Beschicken der Brutschränke mit dem Präparatematerial zu gewährleisten, erfolgte die Aufbereitung der Proben und das Füllen der Kulturschalen simultan. Die Gewebestücke wurden mit der Feinpinzette auf die Edelstahlgrids übertragen, die sich bereits in den Zentralmulden der FALCONTM-Schalen befanden. Mit einer EPPENDORF^R-Pipette wurde dieser Teil mit Nährmedium beschickt. Anschließend wurde die äußere Ringmulde mit Aqua bidest. gefüllt (Einwegpipette 10 ml) um ein Austrocknen der Proben zu verhindern.

Im Gegensatz zu anderen Autoren (z. B. DELONGEAS und GELLY 1984) verzichteten wir darauf, die FALCONTM-Schalen zusätzlich mit flüssigem Paraffin als Verdunstungsschutz abzudichten, da bei vorangegangenen Kulturversuchen mit Eileitergewebe (KEGEL 1985) keine Beeinträchtigung durch Unterlassung dieser Vorsichtsmaßnahme zu verzeichnen war.

Jeweils sechs Schalen wurden auf eine Styroporträgerplatte verbracht und im Brutschrank ASSAB 303GF deponiert.

6.1. Einstellung des Brutschrankmilieus

Da in den einschlägigen Werken (SCHEUNERT und TRAUTMANN 1976, und ROSENBERGER 1977) als durchschnittliche Körpertemperatur rektal gemessen für den Bullen (Rasse Deutsche Schwarzbunte) 38,5 ° Celsius angegeben werden, wobei für Deutsches Fleckvieh um 0,5 ° Celsius niedrigere Werte anzunehmen sind, und die Temperatur im Skrotum um 5 - 7 ° Celsius darunter liegt, wählten wir als Betriebstemperatur für den Kulturversuch 32 ° Celsius. Als CO₂-Betriebsspannung wurden 5,0 Vol. % eingestellt.

6.2. Medienwechsel

Der Wechsel der Nährmedien erfolgte während der laufenden Versuche alle 24 Stunden.

Dazu wurde jeweils ein Styroporträger aus dem Brutschrank entnommen und unter den Flow verbracht. Mit einer EPPENDORF^R-Pipette wurde das alte Medium abgesaugt und die Zentralmulde neu gefüllt. Zum Entfernen und Wiederbeschicken wurde jedesmal eine neue, autoklavierte Pipettenspitze aus Plastik verwendet, um die Gefahr einer Kontamination so gering wie möglich zu halten. Anlässlich des Medienwechsels erfolgte auch regelmäßig die Überprüfung des pH-Wertes. Abschließend wurde der entstandene Flüssigkeitsverlust in den Ringmulden der FALCONTM-Schalen durch Zugabe von Aqua bidest. mit 10 ml-Einmalpipetten ausgeglichen.

6.3. Probenentnahme

Die Entnahmeintervalle wurden nach den unten angeführten Schemata für die beiden verwendeten Nährmedien angesetzt. Nach Literaturangaben war für das Medium 199 ein rascherer Ablauf der Wachstums-, Umbau- und Desintegrationsprozesse zu erwarten als für das Minimal Essential Medium (HALLE 1976).

Zur Aberntung wurde je eine FALCONTM-Schale geöffnet und das vorhandene Medium aus der Zentralmulde mit einer Pasteurpipette abgesaugt. In frühen Entnahmestadien (unter 24 Stunden) ist streng darauf zu achten, daß nicht Probenstücke mit abgesaugt werden, da erst nach diesem Zeitraum die Gewebeproben so fest durch die beginnende Bindegewebsprossung auf den Titangrids verankert werden, daß ein unbeabsichtigtes Entfernen nicht mehr möglich ist.

Zwar existiert die Möglichkeit, die Gewebestücke vor Zusatz der Medien auf den Gittern anzutrocknen ohne den Kulturerfolg in Frage zu stellen, wir verzichten aber im Hinblick auf eine maximale Schonung der Explantate auf diese Maßnahme.

Sofort nach dem Entfernen des Mediums wird 1 Stunde in einer Karnovsky-Lösung fixiert. Nach Ablauf dieses Zeitintervalls wird diese Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend wird die Zentralmulde zweimal mit Cacodylat-Puffer bis zum vollständigen Bedecken der Proben gefüllt. Die zweite Puffercharge bleibt in der Kulturschale.

Mit einer feinen Präparierpinzette wird das Grid fixiert und mit einer Nadel das Gewebe möglichst durch einmaliges, vorsichtiges Anheben vom Gitter gelöst. Wenn alle Probenstücke frei in der Pufferlösung flottieren wird das Grid mit der Pinzette aus der Zentralmulde entfernt. Zum Absaugen der Explantate, was einer Entnahme mittels Pinzette vorzuziehen ist, trennt man von einer Pasteurpipette die Spitze mit einer Ampullensäge im Bereich einer Konusweite von 3 mm ab.

In Schnappdeckelgläsern (5 ml) erfolgt die Lagerung der Proben bei Kühlschranktemperatur.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen vorgesehene Proben werden anschließend osmiert. (Herstellungsschema für Karnovsky- und Osmiumlösung siehe unten.⁺)

⁺) Fixierung nach Karnovsky 1 : 2

2 g Paraformaldehyd lösen in 25 ml A. bid., auf 70 ° C erhitzen, mit 2 - 3 Tropfen 1M NaOH klären, abkühlen lassen

+ 10 ml 25 % Glutaraldehyd

+ 15 ml 0,2M Cacodylatpuffer 7,4

pH auf 7,4 einstellen mit 0,2M Cacodylatpuffer

pH 7,4 1 : 1 verdünnen

(weiter s. S. 19)

⁺) 1 % Osmiumlösung

1 Ampulle (0,1 g) Osmiumoxid in

5,0 ml A. bid. lösen - 2 % Stammlösung

kurz vor Gebrauch für

FI : mit 0,2 M Cacodylatpuffer 1 : 1 verdünnen ⁺)

FII : mit 0,2 M Phosphatpuffer 1 : 1 verdünnen ⁺⁺)

d. h.: 2 ml Osmium-Stammlösung + 2 ml Puffer

⁺) (Forssmann I)

⁺⁺) (Forssmann II)

6.4. Einbettung der Proben

Vor Beginn der Einbettung wurden die Explantate in einer aufsteigenden Äthanolreihe, anschließend in Propylenoxid entwässert. Dann erfolgte die Einbettung in Kunstharz (ERL 4206) nach dem unten angeführten Schema ⁺⁺⁺).

Jeweils 4 Proben wurden schließlich in Aluminiumförmchen ausgebettet.

⁺⁺⁺) Entwässerung und Einbettung

70 % Äthanol I	10 Minuten
70 % Äthanol II	10 Minuten
80 % Äthanol I	10 Minuten
80 % Äthanol II	10 Minuten
90 % Äthanol I	10 Minuten
90 % Äthanol II	10 Minuten
Abs. Äthanol I	10 Minuten
Abs. Äthanol II	10 Minuten
Propylenoxid I	15 Minuten
Propylenoxid II	15 Minuten

Mischungen Propylenoxid/ERL

1. 2 Teile Propylenoxid	+ 1 Teil ERL
2. 1 Teil "	+ 1 Teil "
3. 1 Teil "	+ 2 Teile "

-jeweils 1 Stunde-

In reinem ERL: Über Nacht

(weiter s. S. 20)

+++)
Ausbetten in Förmchen

ERL 4206 (Spurr 1969)

ERL 73,5 g

17,5 g ERL 4206 (= Vinylcyclohexendioxid) = Harz

+10,5 g DER 736 (= Diglycidyläther des Propylen glycols) = Härter

28,0 g

+45,5 g NBA (= Nonenylbernsteinsäureanhydrid) = Härter

73,5 ggut rühren, kurz vor Gebrauch 700 μ l (= 0,7 ml)
DMAE S-1 (= Dimethylaminoethanol) = Beschleuniger
beifügen.6.5. Anfertigung der Semidünnschnitte

Sämtliche Semidünnschnitte wurden auf einem Mikrotom OmU₃ (Fa. C. Reichert, Austria) angefertigt. Bei einem Abstand peripher - median von 200 μ m wurde eine Schnittdicke von 1,5 μ m gewählt. Auf einem Objektträger wurden 5 Schnitte aufgetragen und pro angeschnittenem Gewebestück 10 Objektträger beschickt. Bis Färbeginn wurden die Schnitte auf einer Heizplatte bei 95 ° Celsius gespreitet.

6.6. Färbemethode

Als Methode wurde die Azur-II-Methylenblau-Färbung nach Richardson gewählt. Hiermit ergeben sich Blautöne in abgestufter Intensität bei sehr guter Kontrastierung. Nach Abschluß des Färbeprozesses erfolgte das Eindeckeln der Schnitte mit DEPEX^R. Anschließende Aufbewahrung im Heizschrank bei 85 ° Celsius beschleunigt die Polymerisation.

7. Histochemische Untersuchungen

Ergänzend zu den licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Aktivitäten folgender Enzyme getestet:

- NADH-Tetrazolium-Reduktase
- NADPH-Tetrazolium-Reduktase
- Saure Phosphatase
- Alkalische Phosphatase
- ATP-ase
- Succinatdehydrogenase
- Lactatdehydrogenase

NADH-Tetrazolium-Reduktase

In Analogie zum Vorkommen von NADH findet sich dieses Enzym sowohl inner- als auch außerhalb der Mitochondrien und katalysiert wichtige Schritte im Citratcyclus bzw. in der Atmungskette.

NADPH-Tetrazolium-Reduktase

NADPH ist unter anderem am Pentosephosphatcyclus (HMP-Weg) beteiligt und kommt im Cytosol von Leydigzellen vor (WROBEL 1983).

Saure Phosphatase

Diese lysosomale Hydrolase spaltet Phosphatester einschließlich der Mononucleotide. Lysosomenreich sind phagozyttisch aktive Zellfraktionen wie z. B. Makrophagen.

Alkalische Phosphatase

Diese Mononucleotidase bzw. Phosphomonoesterase weist eine relativ geringe Spezifität hinsichtlich der Lokalisation des Phosphatesters auf. Im Hoden reagieren besonders ausgeprägt peritubuläre Zellen.

ATP-ase

Ein Enzym, das in allen Gewebeformen nachweisbar ist. Unter Einfluß der ATP-ase erfolgt die Abspaltung des terminalen Phosphatrestes aus energiereichen Nucleosidtriphosphaten.

Succinatdehydrogenase

Dieses Flavoproteinenzym besitzt eine Schlüsselfunktion im Citratzyklus bei der Oxydation von Succinat zu Fumarat. Die Lokalisation ist vorwiegend mitochondrial.

Lactatdehydrogenase

Ein tetrameres Enzym in Form fünf verschiedener Isoenzyme. Es ist an der anaeroben Glykolyse beteiligt, wobei in Abwesenheit von Sauerstoff ATP entsteht.

7.1. Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial für die histochemischen Untersuchungen wurden Gewebeproben aus den Versuchsreihen parallel zur Entnahme für die lichtmikroskopischen Untersuchungen asserviert. Die Explantate wurden jeweils in 3-er Packs auf frische Meerschweinchenleberwürfel aufgefroren (flüssiger Stickstoff minus 196 ° Celsius). Unmittelbar daran anschließend wurden die Proben in Aluminiumfolie verpackt und im Arbeitsraum des Kryostaten gelagert.

Folgende histochemische Methoden wurden angewandt:

- Tetrazoliumreduktase nach LOJDA (1965)
- Säuere Phosphatase nach LOJDA (1962)
(BENNES et al. 1961, BARKA und ANDERSON 1962)
- Alkalische Phosphatase (modifiziert nach GOMORI 1952)
- ATP-ase nach von DEIMLING (1964)
- Succinatdehydrogenase nach KUGLER und WROBEL (1978)
- Lactatdehydrogenase (1976)

III. ERGEBNISSE DER KULTURVERSUCHE

1. Zeitplan für die Aberntung der Hodenkulturen

Als erste Maßnahme bei der Präparation erfolgte in jedem Versuchsdurchgang die Bereitstellung der 0-Stunden-Werte mit anschließender, sofortiger Fixierung.

Die maximale Kulturzeit betrug 336 Stunden. Dadurch ergaben sich aufgrund der Parallelität der Ansätze mit Medium 199 und Minimal Essential Medium (MEM) für jeden Versuchsdurchgang 28 Entnahmen (14 pro Einzelmedium) nach folgendem Schema:

1. Entnahme nach 5 Stunden Kulturdauer
2. Entnahme nach 24 Stunden Kulturdauer
3. Entnahme nach 30 Stunden Kulturdauer
4. Entnahme nach 48 Stunden Kulturdauer
5. Entnahme nach 54 Stunden Kulturdauer
6. Entnahme nach 72 Stunden Kulturdauer
7. Entnahme nach 96 Stunden Kulturdauer
8. Entnahme nach 120 Stunden Kulturdauer
9. Entnahme nach 144 Stunden Kulturdauer
10. Entnahme nach 168 Stunden Kulturdauer
11. Entnahme nach 192 Stunden Kulturdauer
12. Entnahme nach 216 Stunden Kulturdauer
13. Entnahme nach 288 Stunden Kulturdauer
14. Entnahme nach 336 Stunden Kulturdauer

2. Lichtmikroskopische Auswertung

2.1. 0-Stunden-Wert

Das lichtmikroskopische Bild zeigt im Zentrum des Blocks Hodengewebe im Zusammenhang. Diese Areale sind eindeutig als die für die Auswertung repräsentativeren Abschnitte anzusehen.

Hier zeigen die Tubuli erwartungsgemäß als typischen Inhalt gut erkennbare Sertolizellen, unterschiedliche Stadien der Spermatogenese, sowie angeschnittene Spermienköpfe im Zentrum. Partiiell findet man an Stelle des intakten Tubulus nur dessen Inhalt in typischer Schichtung ohne Basallamina. Dies ist, ebenso wie das Vorkommen inkompletter Tubuli und von Gewebefragmenten in den peripheren Bereichen der Explantate, als präparationsbedingtes Artefakt anzusehen. Hierzu sind auch die häufig anzutreffenden kleinen Einfaltungen der Basallamina auf Grund möglicher osmotischer Imbalancen während der Präparation zu zählen.

Im interzellulären Bereich sind gut differenzierbare Leydigzellen mit typischem randständigen Nucleolus und wabiger Cytoplasmastruktur zu finden. Die Lage dieser Zellen ist auffallend solitär, nur wenige größere intakte Gruppen stellen sich in Relation dazu dar.

In großer Zahl sind makrophagenartige Zelltypen sichtbar. Präparationsbedingt in den intertubulären Bereich verschleppte Spermatogenesezellen und Spermien erschweren zum Teil eine rasche Zuordnung und Identifikation der originären Zellcompartments in diesen Arealen.

(Abb.1)

2.2. Ergebnisse bei Verwendung von Medium 199

5-Stunden-Wert

In diesem Stadium ist die Struktur der Tubuli weitgehend gut erhalten. Die Gliederung Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatiden von peripher nach zentral ist grundsätzlich vorhanden. Im basalen Compartment ist, verglichen mit dem 0-Stunden-Wert, eine Zellvermehrung feststellbar. An der zentrumwärts gelegenen Grenze dieses Arealis tritt eine zirkuläre Spaltbildung auf.

In einigen Fällen erscheint das basale Compartment stark nekrobiotisch, während gleichzeitig zum Tubuluszentrum hin mehrkernige Zellkomplexe zu finden sind. In denjenigen Tubuli, in denen es durch mechanische Einwirkungen bei der Präparation zu größeren Zellverlusten gekommen ist, zeigt sich eine deutliche Faltung der Basallamina.

Im Interstitium sind neben Gruppen von dicht gelagerten, anscheinend intakten Leydigzellen auch degenerativ veränderte Formen zu sehen, die teilweise relativ große, abgerundete Kernformen mit hellem Zentrum und wandständigem Chromatin aufweisen. Durch Karyorhexis und Pyknose erfolgt ein partieller Verlust von Leydigzellen. Die Blutgefäßwände sind deutlich hypertrophiert. Verantwortlich dafür scheint ein Quellungsvorgang und ein Auseinanderweichen der Mediazellen zu sein. (Abb.2-5)

18-Stunden-Wert

Diese Probe wurde nur bei Medium 199 zusätzlich entnommen. Intratubulär sind vor allem drei Zelltypen zu differenzieren, die anscheinend relativ widerstandsfähig und langlebig sind:

- helle Spermatogonien oder frühe Spermatozyten
- ältere Spermatozyten 1. Ordnung
- runde Spermatiden mit akrosomalem Granulum

Im basalen Compartment hat eine weitere Zellvermehrung stattgefunden. Adluminal kommt es zu einer Spermatidenvergrößerung (Volumenzunahme) mit dadurch bedingter Verlegung des Tubuluslumens. Leydigzellen liegen in kleinen Gruppen und sind relativ klein.

Insgesamt sind die interstitiellen Areale bereits - verglichen mit der Ausgangssituation des 0-Stunden-Wertes deutlich an zellulären Elementen verarmt, und schon in diesem Stadium treten bindegewebige Anteile stärker hervor.
(Abb.6,7)

24-Stunden-Wert

Auffallend sind stark degenerative Veränderungen in den Tubuli. Teilweise sind nur Sertolizellen ohne Spermatogenesezellen zu finden. In anderen Präparaten fehlen Sertolizellen und die Schichtung von Spermatogenesezellen ist nicht mehr vorhanden. Verbreitet kommt es zu einer vakucligen Degeneration und zu einem Zellverlust in den Tubuli.

Im Interstitium findet man noch solitär gut erkennbare Leydigzellen. Ansonsten ist dieser Raum mit unterschiedlichst gestalteten Typen dichtkerniger kleiner Zellen besiedelt, die sich in der elektronenmikroskopischen Betrachtung später als überwiegend degenerativ veränderte Leydigzellen erweisen (s. dort).

Der Quellungszustand der Blutgefäßwände (Arteriolen) hat sich gegenüber dem vorhergehenden Stadium weiter verstärkt.

(Abb.8-10)

30-Stunden-Wert

Der Tubulusanteil an der Gesamtquerschnittsfläche des Präparats ist deutlich reduziert. Dies ist zum einen eine Folge des Verlustes an Tubuli - neben den bereits bei der Präparation zerstörten gehen jetzt auch leichter traumatisierte zugrunde - sowie einer Bindegewebszunahme im intertubulären Bereich. Streckenweise geht die Kontinuität der Basallamina bei einem erheblichen Teil der Tubuli verloren. In einem erheblichen Anteil der Areale lassen sich Leydigzellgruppen feststellen, deren Zahl und qualitativer Zustand deutlich vorhergehende Entnahmestadien übertrifft, so daß der Schluß auf eine vorangegangene Neubildung dieser Strukturen naheliegt. (Abb.11)

Zum Teil liegen aber auch Leydigzellen in aufgelockerten Verbänden und zeigen deutliche Deformationserscheinungen an Kern- und Zytoplasmamembran. Die alterierten Zellformen weisen zum Teil helle Kerne mit randständigem Chromatin auf und sind in der Größe erheblich gegenüber der Ausgangspopulation reduziert.

Die Quellungserscheinungen im Bereich der Arteriolenwandung haben sich weiter verstärkt. (Abb.12)

48-Stunden-Wert

In den Tubuli findet man Areale, in denen Sertolizellkerne in Auflösung begriffen sind (Verdämmungsstadium).

Degenerative Veränderungen treten stärker hervor. Manche Spermatozyten 1. Ordnung erweisen sich als sehr ausdauernd. Die Lamina propria ist deutlich verdickt. Faserige Bindegewebelemente nehmen weiter zu. Dies dokumentiert sich in einer starken Zunahme der fibrozytären Zellformen. Das intertubuläre Gebiet ist stark an Leydigzellen verarmt.

Trotzdem zeigen kleinere Leydiggruppen einen guten Erhaltungszustand. Kleinkernige Zellhaufen erweisen sich als Rudimente ehemals intakter Leydigzellen. Das Auseinanderdriften der Gefäßwandbestandteile ist deutlich fortgeschritten. Querschnitte zeigen eine typische Rosettenform. (Abb.13,14)

54-Stunden-Wert

Der dominierende Anteil der Tubuli ist nur noch in Fragmenten erhalten. Soweit noch vorhanden besteht der Inhalt aus gut erhaltenen Spermatozyten 1. Ordnung - teilweise sind Spermatozyten mit einem Hervortreten des Chromatingerüstes, ähnlich Pachytän- bzw. Zygotänformen, zu finden. Häufig findet man dagegen nur noch leere, blasige Zellformen als Rudimente ehemaliger Spermato-genesezellen. Einfaltungen der Basallamina sind gegenüber dem vorhergegangenen Stadium häufiger. Leydiggruppen guter Qualität (mögliche neue Leydigzellen) sind jetzt gegenüber degenerativ veränderten nur noch eine Minorität. Entrundungen des Zellkerns sind vorherrschend. Durch die fortschreitende Umfangsvermehrung der Gefäßwände werden die intertubulären Areale zum Teil völlig ausgefüllt. (Abb.15,16)

72-Stunden-Wert

Die Tubuli zeigen eine Zellpopulation von relativ homogener Zusammensetzung. Lichtmikroskopisch handelt es sich um Spermatozyten 1. Ordnung. Die Sertolizellen sind nur noch in circa 50 % der ursprünglich vorhandenen Dichte nachweisbar. Die Lage zu den übrigen Tubuluszellen ist ausgeprägt separat (möglicherweise Einfluß der ehemals existenten Blut-Hoden-Schranke).

Die Lamina propria ist deutlich verbreitert. Verantwortlich für dieses Phänomen ist sowohl eine Hypertrophie als auch eine Kontraktion im Bereich der Lamina muscularis die dadurch stark hervortritt. Die gegenüber der Ausgangspopulation kleineren Leydigzellen erscheinen, von der Größenveränderung abgesehen, intakt. Daneben sind in den gleichen Gruppen hellere Zellen zu finden, die auf Grund ihrer stark abgerundeten Form und des randständigen Kernchromatins als avitale Formen anzusehen sind.

Die in großer Zahl vorhandenen makrophagenähnlichen Zellformen erweisen sich in der elektronenmikroskopischen Untersuchung zum überwiegenden Anteil als Leydigderivate. Auffallend ist, daß selbst in diesem fortgeschrittenen Stadium der Kultur die Lymphgefäße keine optisch wahrnehmbare Veränderung aufweisen. Dagegen weisen große Areale des intertubulären Gebietes einen deutlich erhöhten Anteil an fibrozytären Zellelementen auf. Ferner nehmen Tubulusrudimente einen großen Teil dieser Fläche ein. (Abb.17-20)

96-Stunden-Wert

Ein erheblicher Anteil des Tubulusinhalts wird von einer Zellfraktion gebildet, die relativ homogen erscheint und auffallend große, helle Zellkerne aufweist. Hier handelt es sich um ehemalige Spermatogenesezellen, die über keine Vitalität mehr verfügen (elektronenmikroskopischer Befund). Durch die lokalen Kontinuitätsunterbrechungen der Basallamina erfolgt eine starke Einsprossung von Bindegewebe. Intertubulär treten makrophagenähnliche Zellen zahlenmäßig gegenüber den verbliebenen Leydigzellen deutlich in den Vordergrund. Im Elektronenmikroskop erweist

sich, daß ehemalige Leydigzellen das Hauptkontingent der makrophagenähnlichen Fraktion bilden.

Wie in den vorausgegangenen Entnahmestadien ist die stark hervortretende Gefäßwandquellung einer der adspektorisch auffallendsten Befunde.

120-Stunden-Wert

Gegenüber den vorhergehenden Probewerten zeigen sich hier relativ geordnete, gut erhaltene Zell- und Gewebestrukturen. In den Tubuli finden sich zusätzlich zu den vorher beschriebenen Formen Spermatiden und quergeschnittene Spermienköpfe.

Lediglich eine partielle Granulierung des Karyoplasmas und Vakuolisierungen weisen in Richtung degenerativer Veränderungen. Die Keimepithelschichtung wirkt geordnet. Basal finden sich Sertolizellkerne von sehr gutem Erhaltungszustand. Einfaltungen der Basalmembran reichen bis weit in die Lumina der Tubuli. Intertubulär sind gut erhaltene Leydigzellen anzutreffen. Degenerativ veränderte, makrophagenähnliche Formen sind anteilmäßig stark reduziert. (Abb.21)

144-Stunden-Wert

Der Gesamteindruck, den die Präparate dieses Stadiums im Vergleich zur vorhergehenden Entnahmestufe vermitteln, ist wesentlich diffuser. Eine Schichtung des Keimepithels ist nicht mehr erkennbar. Neben häufig mit Zelldetritus gefüllten Tubulusresten sind Spermatogenesenzellen ohne die zugehörige Lamina propria anzutreffen. Ein erheblicher Anteil ehemaliger Tubuluslumina ist bindegewebig durchgebaut. Intertubulär ist ebenfalls ein starker Strukturverlust zu verzeichnen und die Zellen in diesen Bereichen sind weitgehend dedifferenziert. (Abb.22)

168-Stunden-Wert

Die in den Tubuli noch verbliebenen großkernigen, hellen Spermatogenesezellen zeigen einen weitgehenden Vitalitätsverlust (elektronenmikroskopischer Befund) und befinden sich, auch lichtmikroskopisch erkennbar im Stadium des Verdämmerns. Häufig wird das Kernchromatingerüst deutlich sichtbar. Sertolizellen sind dagegen teilweise noch sehr gut ausgebildet.

Eine ausgeprägte Spaltbildung zwischen den Tubuli und dem Interstitium ist in Verbindung mit einem Kontraktionsvorgang im Bereich der Ringmuskelschicht der Tubuli zu sehen. Leydigzellen, die graduell unterschiedlich deformiert wirken (v. a. Eindellungen an der Kernmembran), sind häufig in gut erkennbaren Gruppen zugeordnet zu finden. (Abb.23)

192-Stunden-Wert

Der Tubulusinhalt ist auf deutlich degenerativ veränderte Spermatogenesezellformen reduziert. Häufig sind nur noch Fragmente der Tubuli anzutreffen. Die Lamina propria ist eng gewellt und ihre Schichten erscheinen aufgelockert. Leydigzellen sind teilweise noch gut lokalisierbar, jedoch hat eine Formveränderung in Richtung von Bindegewebszellformen stattgefunden. (Abb.24)

216-Stunden-Wert

Bei der Untersuchung der Präparate dieses Entnahmestadiums dominiert der Eindruck eines starken Zellverlustes. Neben völlig leeren Tubuli trifft man in einigen noch Keimzellgruppen (Spermatozyten 1. Ordnung). Eine Schichtung ist aber nicht mehr erkennbar. Areale, in denen Karyorhexis vorherrscht sind häufig. Auch innerhalb der Lamina propria treten Zellen des mononukleären Typs sowie fibrozytäre

Formen auf. Sertolizellkerne sind in diesem Kulturstadium nicht mehr identifizierbar. Die Basallamina ist stärker als in den vorhergehenden Stadien eingefaltet. Im Interstitium ist eine weitgehende Dedifferenzierung in Richtung fibrozytärer Zellformen zu verzeichnen. Leydigzellen sind ebenfalls stark in ihrer Gestalt verändert. Die charakteristischen Lipidtropfen lassen aber noch eine Identifizierung zu. (Abb.25-27)

288-Stunden-Wert

Bindegewebige Strukturen herrschen vor. Teilweise sind noch Leydigzellen anzutreffen.

336-Stunden-Wert

Es finden sich noch wenige, gut abgrenzbare Tubuli mit avitalem Inhalt, der aus ehemaligen Spermatogenesezellen besteht. Diese Rudimentärtubuli sind stark von Bindegewebe umbaut. Große Areale des intertubulären Bereichs sind völlig strukturlos und weisen keine zellig strukturierte Organisation mehr auf. (Abb.28)

2.3. Ergebnisse bei Verwendung von Minimal Essential Medium (MEM)

5-Stunden-Wert

Außer präparationsbedingten Artefakten sind die Tubuli in Zahl und Gestalt gegenüber dem 0-Stunden-Wert nur unwesentlich verändert. Die Basalmembranen zeigen leichte Faltungsanzeichen. Die Schichtung des Keimepithels ist erhalten und Sertolizellen sind gut zu differenzieren. Leydigzellen weisen partiell geringgradig deformierte Kernmembran auf. In ihrer Umgebung finden sich gruppenweise helle Zellen mit relativ kleinem Kern. Makrophagenartige Formen sind zahlenmäßig nur sporadisch vertreten. Die Gefäßwände im intertubulären Bereich weisen noch keine deutlich wahrnehmbaren Alterationen auf.

24-Stunden-Wert

Sowohl die Basalmembran als auch die Schichtung der Spermatogenesenzellen innertubulär sind in der überwiegenden Zahl der Präparate erhalten. Die Basalmembran ist allerdings streckenweise stärker gefaltet. Im intertubulären Bereich zeigen sich Anzeichen starker Schädigung und weite Areale sind als nahezu zelleer anzusehen. Aber trotz dieser partiell starken Beeinträchtigung treten Leydigzellen lokal in großen Gruppen (Clusterbildung) auf. Die Gefäßwandstruktur des arteriellen Anteils weist starke Lockerungs- bzw. Verquellungserscheinungen auf, vorwiegend bedingt durch eine Umfangsvermehrung im Bereich der Lamina media.

30-Stunden-Wert

Zellfragmente neben noch relativ gut erhaltenen Spermato-genesezellen weisen auf ein Fortschreiten der Schädigungsprozesse innerhalb der Tubuli hin. Intertubulär überwiegen bereits deutlich bindegewebige Strukturanteile. Leydigzellverbände in gut erhaltenen Gruppen sind diffus von hellen Zellen, die deutliche Degenerationserscheinungen aufweisen, durchsetzt.

48-Stunden-Wert

Die Tubuli sind teilweise nur mit Schwierigkeiten von ihrer Umgebung abzugrenzen. Die Form ist häufig ovoid bis nierenförmig, bedingt durch bindegewebige Zubildungen in der unmittelbaren Umgebung. Oftmals ist ein komplettes oder partielles Fehlen der Basallamina festzustellen. Insgesamt weist der Erhaltungszustand der Tubuli eine ausgeprägte Heterogenität auf. Das Keimepithel ist noch deutlich geschichtet. Adluminal der Sertolizellen tritt eine starke Vakuolenbildung auf. Die übrigen Spermato-genesezellen erscheinen dadurch zentral konzentriert. Die Sertolizellen selbst elongieren.

Leydigzellen kommen in Gruppenzuordnung vor. Diese Cluster sind auch in diesem Stadium von den bereits oben angesprochenen hellen Zellen durchsetzt. Außerdem erfolgt hier eine Zunahme mononukleärer Zellformen, die sich in der späteren elektronenmikroskopischen Untersuchung vorwiegend als Leydigderivate erweisen. Die Gefäßwandstrukturen (arteriell) sind deutlicher als in den vorausgegangenen Entnahmestadien verändert, wobei insgesamt eine wesentliche Umfangsvermehrung im Wandbereich stattgefunden hat.

(Abb.29)

54-Stunden-Wert s. Abb. 30

72-Stunden-Wert

Die Tubuluswandungen sind gefaltet. Zusätzlich ist eine partielle Septenbildung erfolgt. Eine deutliche Keimepithelschichtung ist nicht erkennbar. Aber basal in den Tubuli stellen sich gut identifizierbare Sertolizellkerne dar. Häufig ist eine Vakuolenbildung im Tubulus anzutreffen. Ein erheblicher Anteil der T. ist kollabiert. Im Interstitium ist ein deutlich ausgeprägter Zellverlust feststellbar. Die Leydigzellen sind hiervon zwar auch, aber in wesentlich geringerem Umfang, betroffen. Sie finden sich noch in großen Clustern. Die Zunahme bindegewebiger Anteile im Interstitium hat sich weiter verstärkt.

(Abb. 31-33)

96-Stunden-Wert

Generell dominiert in diesem Stadium das Vorkommen geschädigter, teilweise stark veränderter Tubuli. Das divergierende Erscheinungsbild ist bedingt durch graduell unterschiedlich ausgeprägte Faltungsstadien der Tubuluswandung, Formvariationen von zirkulär bis elipsoid sowie durch variierenden zellulären Inhalt. Teilweise sind Tubuli vollständig leer und kollabiert - nur noch an gewellter Lamina propria zu erkennen. Andere Tubuli weisen vor allem Spermatiden als Inhalt auf, die im akrosomalen Bereich oft zu 3-er Packs "verklebt" sind. Teilweise ist aber die Schichtung des Keimepithels noch erhalten. Die Hauptfraktion der Spermatogenesezellen wird von Spermatozyten 1. Ordnung dargestellt. Intertubulär sind Leydigzellen nur noch überwiegend solitär zu beobachten. Deutlich treten im ansonsten stark zellverarmten Interstitium die Gefäße mit stark proliferierten Mediazellen hervor. Die Wandzellen sind deutlich auseinander-

gerückt. Diese Bewegung erfolgt auch lumenwärts. Häufig tritt im Interstitium eine Zellform auf, die ein Übergangsstadium zwischen Leydigzelle und Fibroblast bzw. Fibrozyt darstellt. (Abb.34-37)

120-Stunden-Wert

In den wesentlichen Bereichen stimmen die Erscheinungen in diesem Entnahmestadium mit dem vorhergehenden überein. Die Leydigzellen sind stärker dedifferenziert. Nur in der unmittelbaren Nachbarschaft der Gefäße haben sich einige Cluster erhalten.

144-Stunden-Wert

Partiell sind die Tubuli dieses Stadiums noch gut abgerundet und nicht kollabiert. Eine weitgehend devitalisierte, sehr homogen geformte Zellfraktion füllt die Lumina. Diese Zellen besitzen eine gut erhaltene Kernmembran mit randständigem Chromatin (Verdämmerungsstadium). Das Interstitium ist deutlich zellverarmt. Auffallend ist der heterogene Zustand der Leydigzellen. Sie sind teilweise noch gut identifizierbar (charakteristische Cluster, Lipideinschlüsse), aber in anderen Arealen sind sie bereits stark dedifferenziert (elongiert, fibroblastenähnlich) oder gar nicht mehr sicher zu bestimmen.

Auch in diesem Stadium vermitteln die stark umfangsvermehrten arteriellen Gefäßwände den dominierenden Eindruck im interstitiellen Bereich der Präparate.

168-Stunden-Wert

Auf weiten Strecken ist die Basalmembran der Tubuli durchbrochen. Der Eindruck einer fast vollständigen Desinte-

gration sowohl inner- als auch außerhalb der Tubuli herrscht vor. Sehr häufig tritt wiederum eine persistierende Zellart im Tubulus auf, die große runde Kerne mit sichtbar werdendem Chromatin und relativ helles Cytoplasma besitzt. Sertolizellen sind nur noch andeutungsweise vorhanden (Verdämmern). Intertubulär zeigt sich eine weitgehende Zellarmut. Die wenigen noch auffindbaren Leydigzellgruppen lassen aufgrund häufiger Kernpyknosen und Einziehungen an der Plasmamembran kaum noch auf einen funktionsadäquaten Zustand schließen. Regelmäßiger Befund sind noch kleine rundkernige Zellen (Makrophagentypen), die aber, durch anschließende elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt, über keine Vitalität mehr verfügen. (Abb. 38)

192-Stunden-Wert

Die Strukturen dieses Entnahmestadiums stellen sich verhältnismäßig gut dar. Die Tubuli zeigen häufig noch gut abgerundete Form mit teilweise nur kleinen, unwesentlichen Einfaltungen. Viele wirken - durch eine mögliche Kontraktion der Lamina muscularis - im Lumen reduziert. Nahezu alle noch verbliebenen Tubuli weisen in einem peribasalen Arealadluminal der Sertolizellschicht eine Vakuolenbildung auf. Die noch erkennbaren Zellformen innerhalb der Tubuli (vorwiegend ehemalige Spermatozyten 1. Ordnung) weisen unterschiedlich weit fortgeschrittene degenerative Veränderungen auf. Generell ist in diesem Kompartiment ein sehr deutlicher Zellverlust zu verzeichnen. Im Interstitium ist die Relation zwar zugunsten des Bindegewebes verschoben, das - wahrscheinlich von der Adventitia der Gefäße - eine merkliche Zubildung erfährt, die Leydig- und andere peritubuläre Zellformen weisen aber eine verhältnismäßig gute Strukturerhaltung auf. (Abb. 39, 40)

216-Stunden-Wert

Eine Identifizierung von tubulären Strukturen ist in weiten Arealen der Schnittfläche kaum mehr möglich. Soweit noch erkennbar, besteht der Tubulusinhalt nahezu ausschließlich aus Zelleichen und -fragmenten. Leydigzellen sind in der überwiegenden Zahl der Fälle nicht mehr zu bestimmen. Dominierend sind zellarme bindegewebige Strukturen im Interstitium. In einer nicht mehr als repräsentativ zu bezeichnenden Anzahl finden sich noch relativ gut erhaltene Tubuli. Auffallend ist bei diesen Beobachtungen stets das gleichzeitige Vorkommen von ebenfalls gut strukturierten Leydigzellgruppen in unmittelbarer Nachbarschaft. (Abb.41)

288-Stunden-Wert

Die vorhandenen Tubuli sind weitgehend entvölkert. Im Bereich ihrer Wandungen ist eine starke Verdickung erfolgt, bedingt durch bindegewebigen Einbau und Quellung der Lamina propria, sowie eine starke Einfaltung. Ehemalige Leydigzellen sind in der Form bindegewebigen Kompartimenten angeglichen (Elongation) und häufig in engem Kontakt zu Fibrozyten. Die Media der Gefäßwände ist in diesem Stadium nicht nur umfangsvermehrt, sondern sie weist auch einen erhöhten Gehalt an faserigen Bestandteilen auf.

336-Stunden-Wert

Auf der Schnittfläche des Präparates sind nur noch wenige Tubuli auffindbar. In einem Teil von ihnen ist noch eine lichtmikroskopisch intakt erscheinende - elektronenmikroskopisch beurteilt jedoch avitale - Zellfraktion vorhanden.

Die Querschnittsfläche der Tubuli ist, verglichen mit dem Nativpräparat, erheblich verkleinert. Der starke Einfaltungsgrad sowie der umfangreiche Bindegewebseinkbau um die Basalmembran führt zu bizarren Tubulusstrukturen. Im interstitiellen Bereich sind nur noch bindegewebige Anteile zu finden. (Abb.42)

3. Ergebnisse der histochemischen Untersuchungen

3.1. NADH-Tetrazolium-Reduktase

0-Stunden-Wert

Eine markante Reaktion tritt in den Leydigzellen auf. Kräftig reagieren die Sertolizellen. Im übrigen Tubulusbereich ist die Reaktion schwächer, aber gut erkennbar.

(Abb.44)

3.1.1. Medium 199

5-Stunden-Wert

Wie bei 0-Stunden zeigt sich eine sehr kräftige Reaktion in den Leydigzellen, eine deutliche in den Sertolizellen. Auch der übrige Tubulus reagiert gut erkennbar.

18-Stunden-Wert

Leydigzellcluster reagieren sehr stark. Im gesamten Tubulus zeigen sich Anzeichen einer Auflösung des topographischen Zusammenhanges.

48-Stunden-Wert

Die Reaktionsverhältnisse entsprechen weitestgehend dem 18-Stunden-Wert. Die Intensität in den Leydigzellen ist geringgradig reduziert.

(Abb.43)

54-Stunden-Wert

Besonders markant zeigt sich die Reaktion im basalen Tubulusbereich. Diese Areale entsprechen der Lokalisation der Sertolizellen, die durch Retraktionsvorgänge kompakter geworden sind und dadurch pro Flächeneinheit deutlich reaktiveres Verhalten aufweisen.

72-Stunden-Wert

Die Reaktion der Leydigzellgruppen ist nicht mehr uniform kräftig, sondern zum Teil nur noch auf einzelne Zellen beschränkt. Die Tubulusstruktur befindet sich der Reaktionsintensität und -verteilung nach zu schließen in Auflösung. Deutlich wahrnehmbar reagieren die Blutgefäßwände (Arteriolen). Leydigzellgruppen mit positiver Reaktion zeigen deutliche Größenunterschiede. In den Tubuli nimmt die Intensität von der Peripherie zum Zentrum stark ab, ohne daß sich die reaktiven Areale eindeutig einer bestimmten Zellfraktion zuordnen lassen.

96-Stunden-Wert

Hier ist ein insgesamt deutlicher Rückgang der Reaktionsstärke in den Leydigzellen festzustellen. Nur noch sehr solitär erfolgt eine deutliche Reaktion. Auch in diesem Stadium reagiert die Tubulusperipherie deutlicher als das Zentrum.

120-Stunden-Wert

Leydigzellen zeigen sowohl einzeln als auch in der Fraktion sehr heterogenes Reaktionsverhalten, teilweise noch sehr deutlich positiv. In den Tubuli dagegen hat die Intensität stark nachgelassen. Nur noch im basalen Bereich erfolgt eine Reaktion solitärer Zellen (möglicherweise Sertolizellreste).

3.1.2. Minimal Essential Medium (MEM)

24-Stunden-Wert

Gegenüber der Ausgangssituation ist der Anteil sehr stark reaktiver Leydigzellen reduziert. Mit leicht geringerer Intensität, aber sehr deutlich, reagieren die Wandschichten der Blutgefäße.

48-Stunden-Wert

Leydigzellgruppen reagieren sehr kräftig und homogen. Tubuluszellen zeigen starke Intensitätsunterschiede.

72-Stunden-Wert

Das Reaktionsverhalten der Leydigzellen divergiert stark. Einige Gruppen reagieren sehr kompakt, andere dagegen zeigen merklich abgeschwächte Reaktion. Im basalen Bereich der Tubuli reagiert eine Zellfraktion (sehr wahrscheinlich kontrahierte Sertolizellen) kräftig.

96-Stunden-Wert

Die Reaktion ist nur noch auf kleine Gruppen von Leydigzellen beschränkt. Auch die Tubulusreaktion ist stark vermindert. Hier reagieren nur noch wenige solitäre Zellen, vorwiegend basal, deutlicher.

144-Stunden-Wert

Hier zeigen Areale, deren Struktur gut erhalten ist, eine sehr kräftige und umfangreiche Aktivität der Leydigzellen. Im Basisbereich der Tubuli ist die Reaktion deutlicher als zentrumwärts.

168-Stunden-Wert

Die Leydigzellreaktion, wenn auch flächenmäßig reduziert, ist sehr kräftig. Soweit die Zellstruktur innerhalb der Tubuli erhalten ist, erfolgt noch deutlich positives Verhalten. Gut markiert sich die Reaktion innerhalb starkwandiger Blutgefäße. Dies läßt sich selbst in der Nachbarschaft nekrotischer Bereiche beobachten.

192-Stunden-Wert

In einem Teil der Areale ist die Strukturhaltung noch annähernd mit der Ausgangssituation vergleichbar. Hier reagieren Leydiggruppen sehr markant. (Abb.46)

216-Stunden-Wert

Auch in diesem fortgeschrittenen Stadium finden sich noch, allerdings unregelmäßig, kräftig reagierende Leydigzellen. (Abb.47)

3.2. NADPH-Tetrazolium-Reduktase

3.2.1. Medium 199

5-Stunden-Wert

Das Reaktionsbild stimmt nahezu vollständig mit dem 0-Stunden-Wert überein. Der Tubulusdurchmesser ist relativ groß. Sertolizellen sind nicht deutlich abzugrenzen. Intertubulär dagegen tritt eine kräftige Reaktion der Leydiggruppen auf. (Abb.48)

48-Stunden-Wert

Einzigste Lokalisation einer positiven Reaktion sind die Leydigzellen. (Abb.49)

96-Stunden-Wert

Verglichen mit dem vorhergehenden Wert ist ein zahlenmäßiger Rückgang reaktiver Leydigzellen sichtbar.

216-Stunden-Wert

Die positiven Zellkomplexe sind noch stärker reduziert. Außerdem erfolgt eine sporadische Reaktion in Gefäßnähe.

3.2.2. Minimal Essential Medium (MEM)

24-Stunden-Wert

Gegenüber dem 0-Stunden-Wert zeigt sich die Tubulusreaktion kaum verändert. Die Tubuli sind lediglich geringgradig kleiner. Leydigzellen reagieren überwiegend sehr kräftig. Stellenweise erfolgt die Reaktion aber auch deutlich abgeschwächt.

72-Stunden-Wert

Die topographische Strukturierung der Tubuli hat sich aufgelöst. Leydigzellgruppen reagieren schwach bis kräftig.

96-Stunden-Wert

Auch hier zeigen die Leydigzellen ein ausgesprochen heterogenes Reaktionsverhalten. Kräftig reagieren auch die relativ starkwandigen Gefäße. (Abb.50)

144-Stunden-Wert

Zusätzlich zum vorhergehenden Stadium stellt sich auch die in den Tubuli persistierende Zellfraktion dar.

168-Stunden-Wert

Noch deutliche Reaktion erfolgt im Bereich der Leydiggruppen. (Abb.51)

3.3. Sauere Phosphatase

0-Stunden-Wert

In zwei unterschiedlichen Bereichen fällt die Reaktion kräftig aus: Zum einen in den Sertolizellen im basalen Tubulusbereich und ferner im Interstitium. Hier ist allerdings eine exakte Zuordnung zu einer Zellfraktion nicht sicher möglich (eventuell Leydig- oder helle Zellen).
(Abb.52)

3.3.1. Medium 199

24-Stunden-Wert

Obwohl technisch nicht voll zufriedenstellend zeigen sich Sertoli- und solitäre interstitielle Zellen (Leydig- bzw. assoziierte Zellen) deutlich.

48-Stunden-Wert

Positive Reaktion erfolgt im Bereich von Zellgruppen bzw. Einzelzellen im Interstitium. Die tubuläre Topographie zeigt Auflösungserscheinungen.

120-Stunden-Wert

Im Tubulusbereich ist der Reaktionsverlauf negativ. Interstitiell dagegen reagiert eine große Zahl relativ kleiner Zellen stark positiv. Das Verteilungsmuster spricht für makrophagenartige Zellen.

216-Stunden-Wert

Die positive Reaktion beschränkt sich auf die Tubuluswand und das Interstitium. In letzterem finden sich in unregelmäßiger Verteilung stark positive Einzelzellen (Makrophagen). Auch Leydigzellgruppen erweisen sich durch ihren Lysosomengehalt stark positiv.
(Abb.53)

3.3.2. Minimal Essential Medium (MEM)

24-Stunden-Wert

Vor allem im Bereich der Sertolizellen ist die Reaktion noch sichtbar. Kräftig, aber diffus verteilt, verläuft sie im intertubulären Bereich.

48-Stunden-Wert

Hier zeigen drei Zellfraktionen einen positiven Reaktionsverlauf:

1. Sertolizellen (sehr kräftige Reaktion)
2. Leydigzellen (mittelgradige Reaktion)
3. kleine solitäre Zellen (mittelgradige Reaktion)

96-Stunden-Wert

Die Reaktion innerhalb der Tubuli ist deutlich abgeschwächt und weist auf einen Verlust der topographischen Anordnung hin. Intertubulär fällt die Reaktion lokal kräftig und großflächig aus. In den Gefäßwänden und in der M. propria stellen sich kleine teilweise längliche Zellformen dar.

144-Stunden-Wert

Die Reaktionsverteilung im intertubulären Bereich erfolgt diffus. Gelegentlich sind kleine, positiv reagierende Einzelzellen identifizierbar.

192-Stunden-Wert

Die Intensität hat sich sehr deutlich abgeschwächt. Innerhalb der Tubuli ist kaum noch eine positive Reaktion zu beobachten.

216-Stunden-Wert

In diesem Stadium erfolgt auch in den Leydigzellen nur noch eine schwache Reaktion. Kleine, unregelmäßig begrenzte Zellen im Interstitium reagieren stark positiv.

3.4. Alkalische Phosphatase

3.4.1. Medium 199

5-Stunden-Wert

Die Reaktion ist mit der Situation des 0-Stunden-Wertes vergleichbar. Sie ist in der M. propria nicht ganz gleichmäßig.

24-Stunden-Wert

An den Tubuli zeigen sich deutliche Formveränderungen. Auch die Intima kleiner Gefäße reagiert. (Abb.54)

96-Stunden-Wert

Die Entrundung der Tubulusform hat sich verstärkt. (Abb.55)

120-Stunden-Wert

Die Tubuli sind teilweise völlig geschrumpft. Trotzdem reagiert die M. propria noch sehr deutlich positiv. (Abb.56)

3.4.2. Minimal Essential Medium (MEM)

24-Stunden-Wert

Durch die sehr kräftige Reaktion in den zellulären Anteilen der M. propria stellen sich die Tubuli sehr deutlich dar. Auch in den kleinen Blutgefäßen ist die Reaktion positiv. (Abb.57)

96-Stunden-Wert

Die Tubuli sind geschrumpft. Der positiv reagierende Saum der M. propria hat sich verstärkt. (Abb.58)

120-Stunden-Wert

Die Reaktion im Bereich der M. propria ist deutlich.
Nur kleine Kontinuitätsunterbrechungen sind feststellbar.

144-Stunden-Wert

Auch hier reagieren Anteile der M. propria sehr
kräftig. (Abb.59)

192-Stunden-Wert

Die Tubuluswände sind in unterschiedlicher Intensität kollabiert. (Abb.60)

3.5. ATP-ase

24-Stunden-Wert (MEM)

Eine Verschiebung der Relation von Tubulusareal zu inter-tubulärer Fläche zugunsten letzterer ist deutlich. Die Tubuli sind geschrumpft. (Abb.61)

120-Stunden-Wert (MEM)

Während die Relationen gegenüber dem 24-Stunden-Wert gleichgeblieben sind, erfolgte eine Intensitätszunahme der Reaktion. Besonders tritt dies im Bereich der Gefäßwandungen auf. (Abb.62)

168-Stunden-Wert (MEM)

Auffallend ist die Konturveränderung an den Tubuluswänden. Die M. propria weist häufige Einstülpungen zum Lumen hin auf. (Abb.63)

192-Stunden-Wert (MEM)

Eine stark positive Reaktion erfolgt in der M. propria und im Gefäßwandendothel. Die M. propria ist deutlich stärker gefaltet als im vorhergehenden Stadium. Das Bindegewebe zeigt nur eine unspezifische, diffus verteilte Reaktion. (Abb.64)

3.6. Succinatdehydrogenase

0-Stunden-Wert

Die Leydigzellen reagieren stark. Auch in der Gefäßwand und im Tubulus ist die Reaktion deutlich. Nur schwach zeigt sich die M. propria. (Abb.65)

3.6.1. Medium 199

18-Stunden-Wert

Besonders betont ist die Reaktion in den Leydigzellen.

24-Stunden-Wert

Intertubulär reagieren kleine Zellen positiv, die der Lokalisation nach zu schließen, den Leydigzellen entsprechen.

48-Stunden-Wert

Die Zahl positiv reagierender Leydigzellen hat sich verkleinert. Regelmäßig angeordnete Tubuluskomplexe zeigen eine sehr kräftige Reaktion. (Abb.66)

216-Stunden-Wert

Die Reaktion erfolgt nur noch intertubulär. Hier fällt sie in den Leydigzellen teilweise stark positiv aus.

3.6.2. Minimal Essential Medium (MEM)

24-Stunden-Wert

Die Reaktionsintensität in den Leydigzellen hat sich gegenüber dem 0-Stunden-Wert mäßig verringert. Die topographischen Zusammenhänge sind noch gut erkennbar.

96-Stunden-Wert

Die Größe der Tubuli ist stark verringert. Leydigzellen reagieren unterschiedlich kräftig. Innerhalb der Tubuli treten im basalen Bereich betont positive Komplexe auf.

144-Stunden-Wert

Positiv reagierende Leydigzellgruppen sind zahlenmäßig stark reduziert. Die Intensität und Verteilung der Reaktion ist inhomogen. Innerhalb der Tubuli sind zwar Keimzellen erhalten, die Reaktionsintensität ist jedoch stark eingeschränkt.

168-Stunden-Wert

Stark vereinzelt reagieren in den Tubuli Zellen positiv. Ansonsten zeigt sich in diesem Bereich nur eine geringe Reaktionsintensität. Einige Leydigzellen wirken kräftig und vollständig, in anderen reagieren nur einzelne Granula. (Abb.67)

192-Stunden-Wert

In einigen Tubuli stellen sich positive basale Komplexe dar. Nur noch gelegentlich zeigen sich stark positive Leydigzellgruppen.

216-Stunden-Wert

Innerhalb der Tubuli sind sporadische positive Zellen verteilt. In den intertubulären Arealen zeigt sich ein deutlicher Aktivitätsrückgang. (Abb.68)

3.7. Lactatdehydrogenase

0-Stunden-Wert

Leydig- und Sertolizellen reagieren sehr deutlich und kräftig. (Abb.69)

3.7.1. Medium 199

120-Stunden-Wert

Im intertubulären Bereich reagieren Leydigzellen und andere Zellfraktionen deutlich. In den Tubuli ist die Reaktion sehr unausgewogen.

3.7.2. Minimal Essential Medium (MEM)

24-Stunden-Wert

Die Verhältnisse ähneln noch sehr stark der Ausgangssituation. Da der Umfang der Tubuli reduziert ist, erscheint das Reaktionsareal kompakter. (Abb.70)

48-Stunden-Wert

Die Tubuli haben sich weiter verkleinert. An der Basis der Tubuli erfolgt eine kräftige Reaktion.

96-Stunden-Wert

Auffallend ist das starke Divergieren der Intensität in den Tubuli (kräftig bis fast negativ). Leydigzellen reagieren am deutlichsten in unmittelbarer Nachbarschaft der Gefäße. Die Tubulusgröße hat sich weiter reduziert.

120-Stunden-Wert

Die Verhältnisse sind mit der Situation bei 50 Stunden vergleichbar. Selbst die innerhalb eines Nekroseherdes gelegenen Gefäßwände reagieren kräftig.

168-Stunden-Wert

In Arealen mit gutem Strukturerhaltungszustand zeigen Tubuluszellen, Blutgefäße und Stromazellen eine deutliche Reaktion.

IV. DISKUSSION

Da bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nach unserem Kenntnisstand kein Kulturversuch mit Rinderhodengewebe als komplexem Zellverband über einen längeren Zeitabschnitt unternommen wurde, und bei anderen Tierspezies die Betrachtung vorwiegend auf Zellisolate (MATHER et al. 1981, YEE et al. 1983, JUTTE et al. 1985, HALL et al. 1985) oder Gewebesuspensionen (FRÖHLICH 1980) gerichtet war, ergibt sich für unsere Arbeitsergebnisse das Problem der direkten Vergleichsmöglichkeit mit den Resultaten anderer Untersucher.

Interaktionen zwischen Leydig- und Sertolizellen, allerdings bei Isolaten, untersuchten TABONE et al. (1984). Mit testikulärem Gewebeexplantat von Jungbullen arbeiteten D'OCCHIO et al. (1984). Hier erstreckte sich die Inkubationszeit aber nur auf einen Zeitraum von 4 Stunden nach der Entnahme. Untersucht wurden dabei nicht die Gewebestrukturen, sondern Einflüsse auf die Testosteronsekretion.

Hinsichtlich der beiden verwendeten Nährmedien ist als Ergebnis festzuhalten, daß grundsätzlich sowohl das Medium 199 als auch das Minimal Essential Medium (MEM) die Unterhaltung einer Kultur mit testikulärem Gewebe ermöglichen. So arbeiteten MC CARTHY (1979) und D'OCCHIO (1984) mit Medium 199, während FRÖHLICH (1980) Gewebesuspensionen in MEM inkubierte. In Bezug auf die maximale Überlebenszeit der Gewebeexplantate ergaben sich in unseren Versuchen zwischen den beiden Medien keine Diskrepanzen.

Die vor dem Versuchsbeginn postulierte Erwartung, das spezialisierte, ausdifferenzierte testikuläre Gewebe würde durch die erfolgte Abkoppelung von hypophysären Steuerungsmechanismen in allen Strukturbereichen kontinuierlich dedifferenzieren, bestätigte sich in der vorliegenden Untersuchung nur in Teilbereichen. Diese Tatsache erschwerte auch die exakte Festlegung der maximal zu veranschlagenden Versuchsdauer. Im Gegensatz zu den Erfahrungen KEGEL's (1985) bei Experimenten mit Eileitergewebe, wobei eine Übereinstimmung der Überlebensdauer mit Literaturangaben (HALLE 1976) festgestellt wurde (7 Tage), bereitet die definitive Bestimmung der Überlebenszeit der Explantate in den hier besprochenen Versuchen insofern Probleme, als nach Phasen deutlich feststellbarer Vitalitätsverluste in fortgeschrittenen Kulturstadien Anzeichen von Aktivität vorhanden sind. Der Zeitraum des Eintretens weitgehender Inaktivität liegt aber mit 180 bis 220 Stunden zumindest in der gleichen Größenordnung wie die vorhin genannten Werte.

Einen auffallenden Befund stellt das zeitlich sehr stark variierende quantitative und qualitative Vorkommen von Leydigzellen dar. Nachdem diese Fraktion bis circa zur 50. Stunde der Kulturdauer in Rückgang begriffen ist, treten ab diesem Zeitpunkt wieder Leydigzellen in einer Anzahl auf, die den Schluß nahelegt, daß eine Neubildung bzw. Redifferenzierung erfolgt sein muß. Zur Erklärung dieses Vorgangs bieten sich zwei Möglichkeiten an - Vermehrung vorhandener Zellen durch Teilung oder Differenzierung aus primitiven mesenchymalen Vorstufen (KERR und SHARPE 1985). Da keine Hinweise auf Mitosen vorliegen, scheint die letztere Variante wahrscheinlicher, was Angaben anderer Autoren bestätigen (HOOKER 1948, 1970; CHRISTENSEN 1969, 1975).

Für das erwähnte Neuerscheinen von qualitativ gut differenzierten Leydigzellgruppen bieten auch Resultate von ROOSEN-RUNGE und ANDERSON (1959) sowie von LORDING und DE KRETZER (1972) eine Orientierungshilfe. Danach ist von zwei unterschiedlichen Zellpopulationen als Ursprung für neonatale bzw. für adulte Leydigformen auszugehen. Diesen Sachverhalt legen auch HUHTANIEMI et al. (1984) der Interpretation ihrer Ergebnisse zugrunde. Die letztgenannten Autoren wiesen nach, daß nach Applikation von 600 IU/kg von hCG an 5 Tage alte Sprague-Dawley-Ratten ein Rebound-Effekt mit blockierender Wirkung auf die Funktion der Leydigzellen erfolgte. Zur Kompensation dieser artefiziellen Läsion war bei Neonaten eine Erholungszeit von 3 Tagen, bei Adulten dagegen von 14 Tagen nötig.

Als Hypothese, die sich für unsere Beobachtungen daraus ableiten läßt, ist zu folgern, daß sich das von der übergeordneten Steuerung der Hypophyse abgekoppelte Gewebe der Kulturversuche in Richtung neonataler Verhältnisse dedifferenziert. Da hier aber, wie bereits angesprochen, eine andere Fraktion mesenchymaler Zellen als Grundlage für die Neubildung von Leydigzellen dient, entstehen bzw. erholen sich diese in Analogie der Verhältnisse bei Neonaten. Das vermehrte Auftreten von Leydigzellen nach 2 bis 3 Tagen Versuchsdauer weist in diese Richtung und stimmt in der Größenordnung mit dem von HUHTANIEMI et al. (1984) angegebenen Zeitraum der Erholung neonataler, androgenproduzierender Zellen überein.

Dieses Phänomen gewinnt dadurch an Komplexität, daß es zum einen als integraler Bestandteil von Interaktionen zwischen tubulären Elementen und Anteilen des Interstitiums aufzufassen ist - andererseits jedoch selektive Transportbarrieren (SHARPE 1984) zwischen diesen in engem funktionalen Zusammenhangstehenden Compartments existieren, die ein eigenständiges Mikromilieu innerhalb dieser Teilareale ermöglichen.

Bei diesen Barrieren handelt es sich erstens um das Gefäßendothel (KORMANO 1967), zweitens die peritubulären Zellen, die um die Tubuli seminiferi angeordnet sind (DYM und FAWCETT 1970) und welche beim Rind als Sonderfall aus Myofibroblasten bestehen (WROBEL et al. 1979). Als dritte und wichtigste (SETCHELL 1978, SHARPE 1984) bewirkt die Barriere auf der Ebene der Tight junctions zwischen den Sertolizellen die Ausbildung des für die Entwicklung der haploiden Keimzellen notwendigen Milieus.

Diese Segmentierung bewirkt nach SHARPE (1985) eine Konzentration von Mediatoren (= Hormone), die erst eine Interaktion zwischen Tubulus und Interstitium ermöglichen. Bedeutsam erscheint innerhalb dieser Wechselwirkungen vor allem die gegenseitige Beeinflussung zwischen Sertoli- und Leydigzellen. Sie manifestiert sich darin, daß Sertolizellen einen trophischen Effekt auf Leydigzellen ausüben und der stimulierende Effekt von FSH auf Leydigzellen von Sertolizellen vermittelt wird (TABONE et al. 1984). Dadurch ist die Erhaltung eines gut ausgebildeten glatten endoplasmatischen Reticulums und eine erhöhte Steroidsynthese bei porcinen Leydigzellen in vitro möglich (TABONE 1984).

Aufgrund der beim Rind abweichenden Situation mit dem Vorhandensein eines MER (= Mixed Endoplasmatic Reticulum) nach WROBEL et al. (1981) ist für diese Spezies eine gesonderte Überprüfung dieses Sachverhalts nötig. Die Synthese von testikulärem LHRH in den Sertolizellen und die dadurch an Leydigzellen bewirkte Modulation der Testosteronsekretion (SHARPE 1985) ist an diesem Phänomen möglicherweise ebenfalls beteiligt. Testikuläres LHRH ist als Substanz jedoch noch nicht nachgewiesen.

Nach BERGH (1982, 1983) üben auch Tubuli seminiferi auf Stufe 7 des Spermatogenesezyklus (vgl. LENGFELDER 1978) einen lokalen Effekt auf die assoziierten Leydigzellen aus. Für letztere Hypothese ließ sich in unseren Versuchen keine definitive Bestätigung finden, da innerhalb des Keimepithels relativ frühzeitig Störungen der Schichtung und Ausdifferenzierung auftraten, während Sertolizellen und Lamina propria noch einen qualitativ guten Erhaltungszustand aufwiesen. Der Grund für diese im Gegensatz zu den Keimzellen große Ausdauer der Sertolizellen ist möglicherweise in der nach WRIGHT und FRANKEL (1980) um das 10-fache größeren Anzahl an Androgenrezeptoren dieser Fraktion im Vergleich zu den Spermatogenesenzellen zu suchen.

ISOMAA et al. (1985) dokumentierten die unterschiedlichste Verteilung dieser Rezeptoren in den verschiedenen Compartments der Testes juveniler (3 bis 5 Monate alter) Sprague-Dawley-Ratten und fanden in den Tubuli segmentweise Unterschiede. Vergleicht man hiermit die Ergebnisse von STEVENS und STEINBERGER (1983) - sie wiesen nach, daß eine quantitative Aufrechterhaltung der Spermatogenese bei hypophysektomierten Ratten nur bei Substituierung des Testosteronspiegels im Normalbereich möglich ist - läßt sich folgern, daß bei sinkenden Androgenkonzentrationen Zellen mit der größten Rezeptorenzahl, hier also die Sertolizellen, am längsten funktionsfähig bleiben.

Da aber auch längs der Tubuli seminiferi eine unterschiedlich dichte Verteilung der Rezeptoren vorliegt (SHARPE 1985), wodurch unterschiedliche Intensitäten der Interaktionen mit dem Interstitium bedingt sind, wird die Situation im Semidünnschnitt verständlich, wenn Areale mit gut ausgebildeten Leydigzellgruppen mit benachbarten, qualitativ ansprechenden Tubuli neben Abschnitten vorkommen, in denen diese Strukturen nur noch rudimentär existieren oder bereits völlig verschwunden sind. Es bleibt aber als Befund unserer Untersuchungen festzuhalten, daß ein guter qualitativer Erhaltungszustand der Tubuli stets mit einem entsprechenden Vorhandensein von Leydigzellen in den von uns kultivierten Gewebeexplantaten gekoppelt ist.

Essentiell für die Funktionsfähigkeit ist auch der Zustand der Lamina propria. Nach WROBEL et al. (1979) bilden 3 bis 5 Lagen flacher, peritubulärer Zellen (Myofibroblasten) in konzentrischer Schichtung das morphologische Substrat dieser Struktur beim Rind. Elastische Anteile sind vor allem basal, in geringerem Umfang auch zwischen den peritubulären Zellagen zu finden. Zusätzlich kann ein Spaltraum um den eigentlichen Tubulus seminiferus auftreten, der von endothelähnlichen Zellen ausgekleidet ist.

Bedeutsam ist die Feststellung, daß die im präpuberalen Zustand nicht kontraktile Fibroblasten sich während der Pubertät unter FSH- und Androgeneinfluß glatten Muskelzellen angleichen (WROBEL und SINOWATZ 1982). VERHOEVEN (1980) vermutet eigene Androgenrezeptoren in den Myoidzellen. Da diese Zellen den Umfang der Sekretion der Sertolizellen beeinflussen (NAKHLA et al. 1984), ist eine Bedeutung der Testosteronwirkung in Bezug auf die Tubuli seminiferi ähnlich dem Einfluß auf Mamma- und Prostataepithel über benachbarte mesenchymale Zellen (CUNHA et al. 1980, HEUBERGER et al. 1982, WASNER et al. 1983) anzunehmen.

Diesen Feststellungen ist noch die bereits oben erwähnte Barrierefunktion der Myofibroblastenschicht (DYM und FAWCETT 1970, SHARPE 1984) anzufügen. Hierdurch ist die Aufrechterhaltung eines Mikromilieus innerhalb des Tubulus möglich. Für das Verhalten der Lamina propria in der Gewebekultur haben diese Sachverhalte in mehrfacher Hinsicht eine Bedeutung. So ist festzuhalten, daß Kontinuitätsunterbrechungen dieser Struktur auch in frühen Stadien der Inkubation bei sonst durchaus noch gutem Erhaltungszustand der Präparate zum Verlust des entsprechenden Tubulus führen. Hierfür maßgebend scheint der Verlust bzw. das nicht mehr mögliche Aufrechterhalten des Mikromilieus. Die ebenfalls bereits frühzeitig erfolgende Redu-

zierung des Tubulusdurchmessers bei den überdauernden Tubuli seminiferi ist eventuell eine reflektorische Maßnahme, durch verstärkte Kontraktion der Myofibroblasten die Barrierewirkung zu verstärken. Darin ist auch eine der Ursachen für die Verdickung der Lamina propria im fortgeschrittenen Kulturstadium zu suchen. An diesem Vorgang ist aber auch eine Zunahme der bindegewebigen Komponenten beteiligt. SHARPE und BARTLETT (1985) erwähnen als weiteren Faktor in diesem Geschehen ein Peptid mit stimulierender Wirkung auf die Testosteronproduktion und gleichzeitiger Hemmung des Testosteronausflusses in das Interstitium.

Die partiell auftretende circatubuläre Spaltbildung ist dadurch erklärbar, daß die Myoidanteile der peritubulären Zellschichten unterschiedlich hoch sind und vor allem zur Basallamina hin fibrozytäre Strukturen dominieren (WROBEL 1979). Dadurch bedingt ist ein unterschiedliches Kontraktionsvermögen der peritubulären Schichten, wodurch die bereits vorhandene Spaltbildung verstärkt wird.

Die Sertolizelle in ihrer Targetfunktion für FSH und ihre Mediatorwirkung auf die Leydigzelle wurde bereits erwähnt. TUNG und FRITZ (1980) sowie HUTSON und STOCCO (1981) zeigten, daß peritubuläre Zellen in Kokultur mit Sertolizellen die ABP (= Androgen Binding Protein)-Bildung stimulieren. Die bindegewebige Zunahme innerhalb der Lamina propria reduziert möglicherweise diese Stimulation.

Die zu beobachtende Elongation der Sertolizellen mit zunehmender Kulturzeit weist darauf hin, daß auch diese Fraktion zunehmend in fibrozytärer Richtung dedifferenziert. Der von DIAS und REICHERT (1984) im Rinderhoden nachgewiesene Inhibitor der FSH-Bindung hat auf diesen Vorgang dagegen sehr wahrscheinlich keinen Einfluß, da aufgrund der Abkopplung von der

Hypophyse im Explantat ohnehin keine FSH-Zuführung mehr erfolgt. Ein Fehlen dieses Hormons bewirkt bei Sertolizellen einen Verlust der zytoplasmatischen Fortsätze (HUTSON und STOCCO 1978). Damit einher geht ein Verlust an Ordnung innerhalb der Keimepithelschichtung. Die von den letztgenannten Autoren genannte Aktivitätsdauer der nicht FSH-stimulierten Sertolizellen liegt mit 48 Stunden im gleichen zeitlichen Bereich, nach dessen Ablauf in den Gewebeexplantaten durch Rückbildung der cytoplasmatischen Fortsätze die Ordnung in den adluminalen Compartments der Tubuli verlorengeht.

Demzufolge scheint die Aktivitätsdauer der Sertolizellen im Isolat annähernd gleichlang wie im Organgewebe zu sein. Das basale Compartment ist dagegen bis circa zur 72. Kulturstunde abgrenzbar. Die Lokalisation der Begrenzung ist anscheinend mit dem Vorhandensein der Blut-Hoden-Schranke identisch. Bei der Ratte wiesen HOFFER und HINTON (1984) die Zonula occludens als einzige Strukturkomponente dieser Schranke im Nebenhoden nach. In den Testes dagegen agieren nach Angabe dieser Autoren die Junctions zwischen den Sertolizellen als die vorgeschobenste Barriere.

Nach WROBEL und SINOWATZ (1982) ist die Funktion der Blut-Hoden-Schranke beim Rind als Diffusionsbarriere zum adluminalen Compartment der Tubuli seminiferi aufzufassen und trennt von diesem außer den Sertolizellen auch die Spermatogonien und präleptotänen Spermatozyten. Möglicherweise liegt hier die Erklärung für das relativ lange Überdauern von Spermatozyten 1. Ordnung in den Tubuli der Kulturexplantate. Die Versorgung diesseits der Blut-Hoden-Schranke ist anscheinend erheblich günstiger als adluminal.

Die Zellverbindungen, die die Blut-Hoden-Schranke bilden, sind den Ergebnissen von HOFFER und HINTON (1984) zufolge sehr fest. Eine Wirkung von Gossypol, einer bei maskulinen Tieren contraceptiv wirksamen Verbindung, war nach ihren Angaben an den Zonulae occludentes von Rattenhoden nicht feststellbar.

Aufgrund der großen speziesbedingten Differenzen (FAWCETT 1973) gerade bezüglich der Blut-Hoden-Schranke ist die Übertragung dieser Erfahrungen auf die Situation beim Rind sicher nicht ohne weiteres möglich. Die von uns beobachtete relativ lange erhaltene Compartmentierung basal im Tubulus legt aber den Schluß nahe, daß die Verbindung der Sertolizellen auch unter Kulturbedingungen lange stabil bleibt und erst im Rahmen fortgeschrittener Dedifferenzierungsvorgänge Einbußen erfährt.

Die Entfernung zu den Lymphgefäßen hingegen scheint für das Verhalten der Leydigzellen in der Gewebekultur allenfalls von untergeordneter Bedeutung zu sein. Wir fanden keinen Hinweis darauf, daß die unterschiedliche Distanz einen Einfluß auf die Qualität und die Zahl dieser Zellpopulation ausübt. Die innerhalb der Fraktion bestehende Kommunikationsfähigkeit durch Canaliculi (WROBEL et al. 1981) scheint auch entfernten Leydigzellen den Kontakt zum intertubulären Netzwerk der Lymphgefäße zu ermöglichen.

Auffallend sind dagegen die Veränderungen, welche die arteriellen Gefäße des Interstitiums während der Kulturzeit erfahren. Die Verdickung der Wandschichten ist als pathologischer Befund auch beim Menschen in hohem Alter, bei Kryptorchismus und bei einer Varikocoele zu beobachten (SHARPE 1984, SUORANTA 1971). Da nach SHARPE 1984 LH- bzw. LHRH-Rezeptoren an den Gefäßen nicht nachgewiesen sind, wird postuliert, daß über die Leydigzellen ein vasoaktiver Faktor freigesetzt wird. Dieser beeinflusst die Gefäßwandpermeabilität und hat dadurch entscheidenden Anteil an der Regulation des Testosterongehalts der Flüssigkeit im Interstitium und ist deshalb nach SHARPE 1984 von zentraler Bedeutung für die Organfunktion (interstitial fluid = "lifeline" of the testis). Ob die zunehmende Verringerung des Gehalts an vasoaktivem Faktor für das Auseinanderdriften der Gefäßwandschichten verantwortlich ist, oder Quellungsvor-

gänge in der glucosaminglycanreichen Media (LEHNINGER 1977) die Veränderungen bewirken, bedarf noch weiterer Untersuchung. Eine retrograde Entwicklung in Richtung präpuberaler Verhältnisse ist als Erklärungsmodell für dieses Verhalten weniger wahrscheinlich, da nach SINOWATZ und WROBEL (1983) bereits in der infantilen Phase der postnatalen Hodendifferenzierung ausgebildete Blutgefäße im intertubulären Gewebe nachweisbar sind. Nicht übersehen werden darf hier allerdings auch der physikalische Einfluß durch Fehlen des in vivo vorhandenen Blutdrucks (vgl. Lehrbücher der Physiologie).

Betrachtet man als weiteres wichtiges intertubuläres Compartment die Fraktion der Makrophagen, so wäre für die vorliegende Situation in der Gewebekultur schon aufgrund der nicht zu eliminierenden Traumata bei der Präparation sowie des gegenüber dem originären Zustand stark erhöhten Anteils an Zelldetritus eine verstärkte Aktivität und eine quantitative Zunahme der Makrophagen zu erwarten.

Für diese Annahme fanden sich aber in den lichtmikroskopischen Untersuchungen kaum Belege. Auch histochemisch war kein dramatischer Anstieg entsprechender Enzymaktivitäten (saure Phosphatase) zu verzeichnen. MAGALHAES et al. (1980) stellten dagegen bei orchidektomierten Ratten eindeutig erhöhte Makrophagenzahlen sowie eine größere phagozytotische Potenz dieser Fraktion fest. Diese generelle Erfahrung läßt sich wie vorhin angedeutet anscheinend nicht auf die Situation des Gewebeexplantates übertragen. Vielmehr scheinen unsere Ergebnisse die Feststellungen von YEE et al. (1983) zu bestätigen, die eine direkte Abhängigkeit der Aktivität testikulärer Makrophagen von der FSH-Konzentration nachwiesen. Ein Unterbinden der FSH-Zufuhr zieht dementsprechend sehr wahrscheinlich eine verminderte Makrophagenaktivität nach sich. Dieselben Autoren (YEE et al. 1983) zeigten, daß die Sekretionsprodukte von Hoden-

makrophagen (z. B. Lactat) eine wichtige Rolle für die Funktion dieses Organs in toto besitzen. Der durch die fehlende Hormonzufuhr bedingten reduzierten Funktionsfähigkeit der Makrophagen kommt demnach neben anderen Faktoren eine Bedeutung für die Beeinträchtigung vitaler Prozesse im explantierten Gewebe zu.

Die Frage, ob mit einem Mehraufwand an Kulturtechnik eine erhebliche Verlängerung der Überlebenszeit der Gewebeexplantate zu erzielen ist, bedarf einer weiteren Klärung. Ebenso sind modifizierte Präparationstechniken auf ihre Eignung zu überprüfen, da die besonders in frühen Entnahmestadien (vergleiche 5-Stunden-Wert) auftretenden Läsionen und Artefakte dadurch möglicherweise eliminierbar sind. Derzeit erhältliche Anleitungen zur Durchführung von Gewebekulturen (MC CARTHY et al. 1979) erscheinen in diesem Punkt ergänzungsbedürftig.

Da, wie bereits erwähnt, eine große Zahl von Funktionsabläufen im Hoden durch Interaktionen der einzelnen Compartments bestimmt werden und auch innerhalb der Teilbereiche Situationen oft polyfaktoriell beeinflusst sind, ist zur Klärung der aufgezeigten, noch offenen Fragen die stufenweise Optimierung des Milieus der Nährmedien der Gewebekulturen bei zukünftigen Versuchen eine zentrale Forderung. Vorrangig ist hier eine Substitution von FSH anzuführen, das zumindest indirekt alle wesentlichen testikulären Strukturen beeinflusst.

Auch Vitamin E ist hinsichtlich seiner Wirkung zu prüfen, da MATHER et al. (1981) an Leydigzellkulturen nachwiesen, daß dadurch die Lebensdauer erheblich verlängert wurde. Der Zusatz von 200 ng/ml an α -Tocopherol (Vit. E) ermöglichte ein Fortführen der Kulturen für mehr als 2 Wochen ohne zahlenmäßige oder funktionelle Einbußen an den Leydigzellen.

Ferner bietet sich ein Variieren des Calcium-Gehalts des Nährmediums an, da nach den Erfahrungen von SACKS et al. (1985) das Ausdifferenzieren von Epithelien bei einer Unterversorgung beeinträchtigt wird. Da von denselben Autoren auch ein unterschiedliches Verhalten von Zell- und Gewebekulturen bei gleichem Calciumspiegel festgestellt wurde und die gebräuchlichen Medien ursprünglich vorwiegend zur Verwendung bei Zellkulturen vorgesehen wurden, ergeben sich daraus auch Folgen für inkubierte Gewebeverbände.

Schließlich ist eine Überprüfung weiterer Enzymaktivitäten nötig. Hier seien als Beispiele nur die Monooxygenasen 17 α -Hydroxylase und die C17-20 Lyase genannt. KINOSHITA et al. (1985) zeigten eine Parallelität der Aktivitätsabnahme dieser Enzyme mit dem altersbedingten Rückgang der Leydigzellfunktion.

V. Zusammenfassung

Im In-vitro-Versuch wurde das Verhalten von Gewebeexplantaten des Rinderhodens als Modellorgan unter Ausschaltung der übergeordneten Regulationsebenen Hypophysenvorderlappen und Hypothalamus untersucht.

In Versuchsreihen von jeweils 336 Stunden Gesamtdauer wurden Parallelversuche mit zwei verschiedenen Nährmedien - Medium 199 und Minimal Essential Medium (MEM) - durchgeführt. Nach der Inkubation erfolgte die Probenentnahme in jeweils 14 Entnahmestufen. Die Untersuchung erfolgte lichtmikroskopisch und histochemisch.

In Relation zur Versuchsdauer wurden regelmäßig auftretende Abläufe festgestellt, die für zukünftige Untersuchungen eine Standardisierung der Arbeitsmethodik ermöglichen.

Im Vergleich zwischen den zwei verwendeten Nährmedien zeigten sich im Hinblick auf die maximale Überlebenszeit der Gewebeexplantate keine Diskrepanzen. Weitgehende Inaktivität tritt im Zeitraum von 180 bis 220 Stunden ein.

Nur in einigen Strukturbereichen, wie z. B. den Blutgefäßwänden, erfolgt eine kontinuierliche Dedifferenzierung der zellulären Bestandteile. Dagegen unterliegt vor allem das Vorkommen von Leydigzellen in qualitativer und quantitativer Hinsicht größeren Schwankungen. Bei Verwendung von Medium 199 sind diese Vorgänge stärker ausgeprägt als bei Gebrauch von Minimal Essential Medium.

Ein guter qualitativer Erhaltungszustand der Leydigzellen ist immer mit gut erhaltenen Tubuli gekoppelt.

Dagegen fand sich kein Hinweis, daß die unterschiedliche Entfernung zu den Lymphgefäßen das Verhalten der Leydigzellen beeinflusst.

Auch ein zu erwartender deutlicher Anstieg der Makrophagenaktivität im interstitiellen Bereich war nicht nachzuweisen.

Kontinuitätsunterbrechungen der Lamina propria führen zum Verlust des entsprechenden Tubulus auch bei sonst gutem Erhaltungszustand des Präparates. Bei den überdauernden Tubuli erfolgt eine Reduzierung des Durchmessers durch Kontraktion der Myofibroblasten und eine Wandverdickung durch Zunahme der bindegewebigen Anteile. Partiell tritt eine circatubuläre Spaltbildung auf.

Innerhalb der Tubuli erfolgt ein Verlust der Zellordnung in den adluminalen Compartments bereits mit ca. 48 Stunden, während dies in den basalen Abschnitten erst ab ca. 72 Stunden zu beobachten ist.

Neben den Sertolizellen bilden Spermatozyten 1. Ordnung die langlebigste Zellfraktion innerhalb der Tubuli.

Summary

Histological and histochemical research on reproductive gland explants of the male bovine in the tissue culture test

In the In-vitro-test the behaviour of tissue explants from the bovine testis as a model organ has been examined under elimination of the over-set level grounds of regulation, the adenohypophysis and the hypothalamus.

In test files of 336 hours each parallel tests with two different types of nutritious media - Medium 199 and Minimal Essential Medium (MEM) - have been conducted. After incubation the taking of samples was done in 14 steps respectively. The examination was performed both lightmicroscopically and histochemically.

relating to the duration of the tests periodical events have been detected which will allow a standardization of the operating method of future investigations.

Comparing the two nutritious media used no discrepancies concerning the maximum time of survival of the tissue explants have been found. Extensive inactivity is arising within the period between 180 and 220 hours.

Only in some structural zones like for example the walls of the blood-vessels a continuing dedifferentiation of the cellular elements is occurring.

On the other hand however, the presence of Leydig cells is subjected to larger fluctuations both in quality and quantity. When using Medium 199 these phenomena are more distinct

than when using Minimal Essential Medium.

A good qualitative state of conservation of the Leydig cells is always connected with well preserved tubules.

However no indication has been found that the different distance to the lymph vessels should have an influence on the behaviour of the Leydig cells.

There has been no proof for a marked rise of the activity of the macrophages in the interstitial area, as was first to be expected.

Disconnections of the continuity of the Lamina propria will lead to a loss of the corresponding tubule even if the state of conservation in other areas of the explant is still good. The surviving tubules show a reduction of the diameter by contraction of the myofibroblasts and a thickening of the wall by an increase of the connective tissue. Partially a circatubular fissure formation is to be found.

Within the tubules a loss of the cellular arrangement in the adluminal compartments is found within about 48 hours while in the basal areas this phenomenon cannot be observed before 72 hours.

Besides the Sertoli cells the primordial spermatocytes form the cell group of the highest longevity within the tubules.

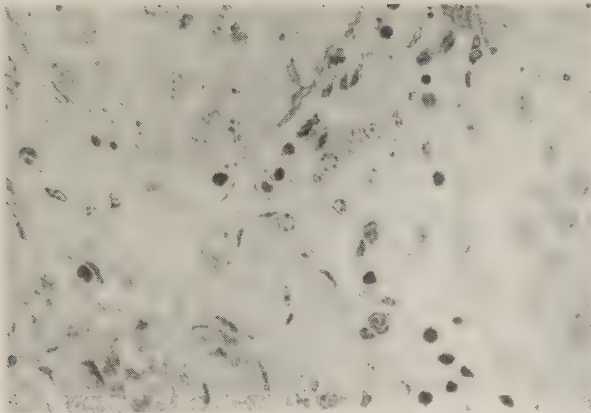


Abb. 1

0-Stunden-Wert

Situation unmittelbar im Anschluß an die Präparation.

Im Bild oben links sowie am rechten Rand jeweils ein Tubulus angeschnitten.

560 x

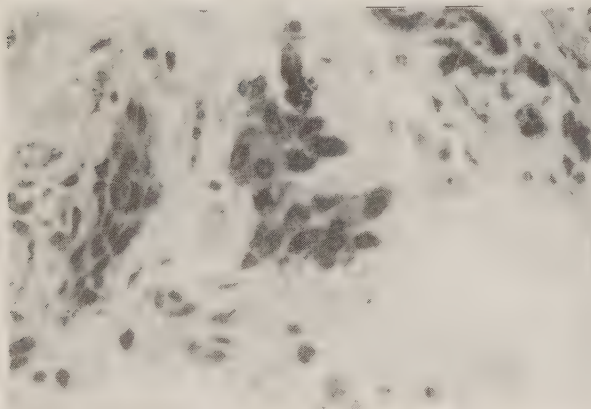


Abb. 2

5-Stunden-Wert (M 199)

Gruppe dichter, intakter Leydigzellen

560 x

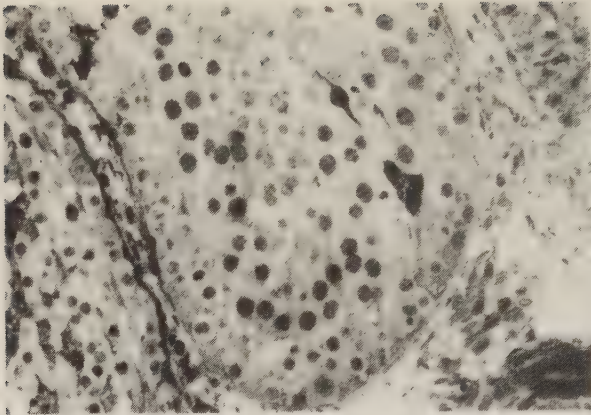


Abb. 3

5-Stunden-Wert

Keimepithelschichtung von peripher nach zentral Spermatogonien, Spermatozyten, Spermatischen.

Im basalen Compartment eine Zellvermehrung. Lückenbildung an der Kompartimentgrenze.

350 x

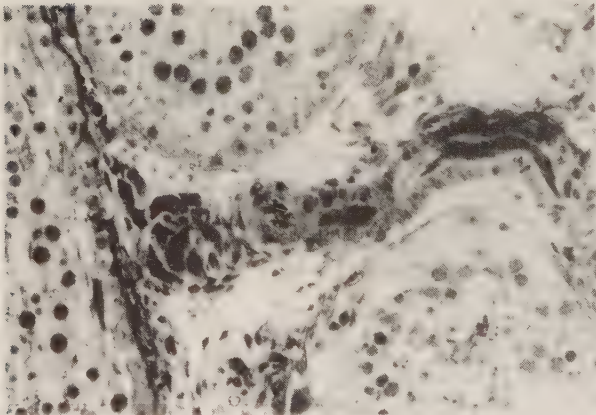


Abb. 4

5-Stunden-Wert (M 199)

Blutgefäßwände verdickt infolge Quellung und Auseinanderweichen der Mediazellen.

Starker Zelluntergang im Interstitium.

350 x

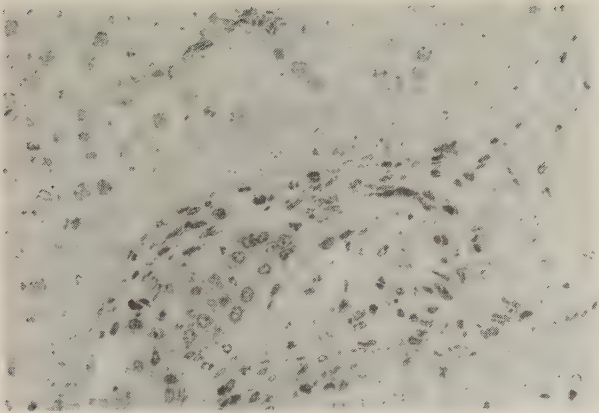


Abb. 5

5-Stunden-Wert (M 199)

Der rechte Tubulus zeigt gefaltete Basallamina, wahrscheinlich infolge Zellverlustes durch mechanische Einwirkung. Im oberen Tubulus eine sehr deutliche Kompartimentgrenze. Im basalen C. Zellproliferation, dadurch Verlust des Lumens. Partieller Ausfall der Leydigzellen durch Karyorhexis und Pyknose.

350 x

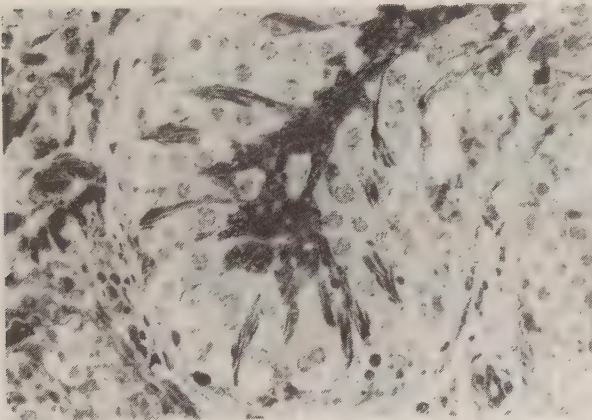


Abb. 6

18-Stunden-Wert (M 199)

Zellvermehrung im basalen Compartment. Spermatiden (gestreckt) in Degeneration. Hinweis auf mögliche besonders ausgeprägte Empfindlichkeit dieser Zellform.

350 x

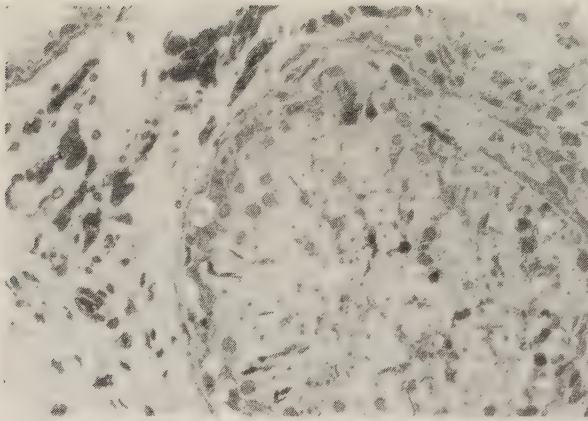


Abb. 7

18-Stunden-Wert (M 199)
Schädigung des basalen Compartiments und ad-
luminale Vergrößerung der Spermatiden mit Ver-
legung des Tubuluslumens. Im relativ zellarmen
Interstitium Leydigzellen in kleinen Gruppen
mit dazwischenliegenden Makrophagenformen.

350 x

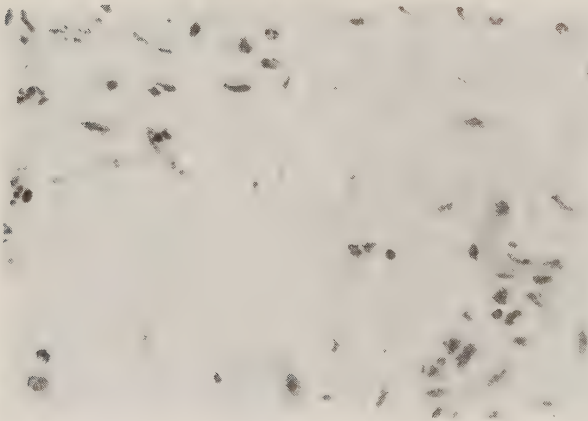


Abb. 8

24-Stunden-Wert (M 199)
Sertolikerne im Tubulus ohne Keimzellen

560 x

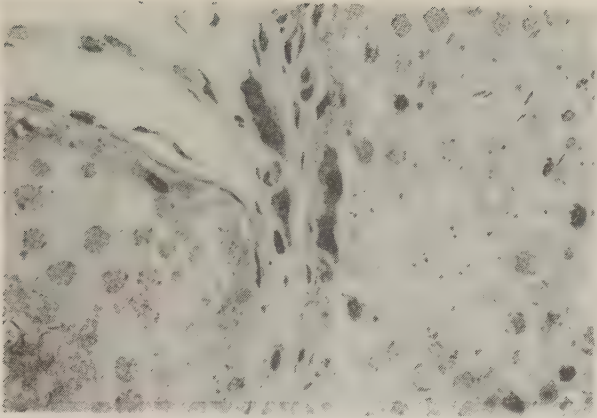


Abb. 9

24-Stunden-Wert (M 199)

Gut erhaltene Leydigzellen

560 x

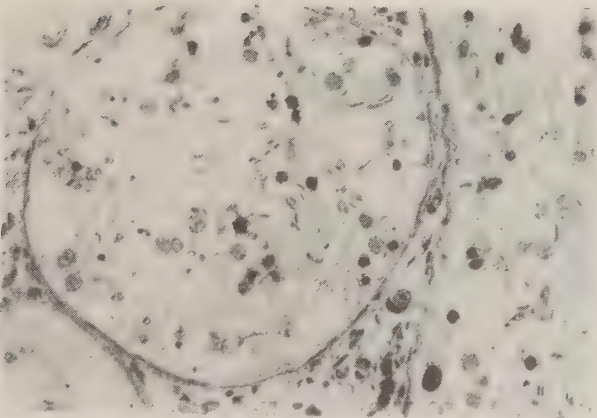


Abb. 10

24-Stunden-Wert (M 199)

Vakuolige Degeneration und Zellverlust in den Tubuli. Keimepithelschichtung nicht mehr deutlich - möglicherweise verursacht durch Verlust der ordnenden Sertolizellen.

350 x

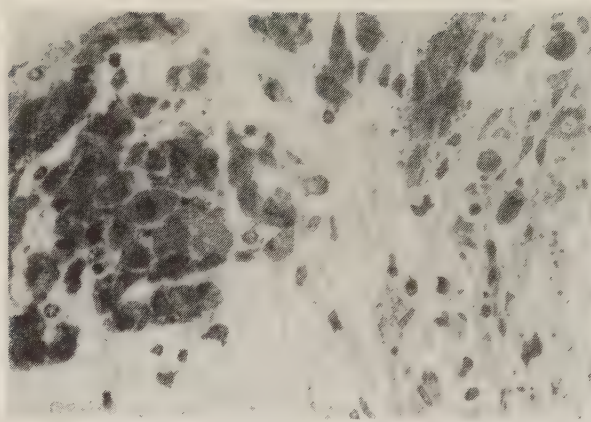


Abb. 11

30-Stunden-Wert (M 199)

Leydigzellen im Gruppenverband

560 x

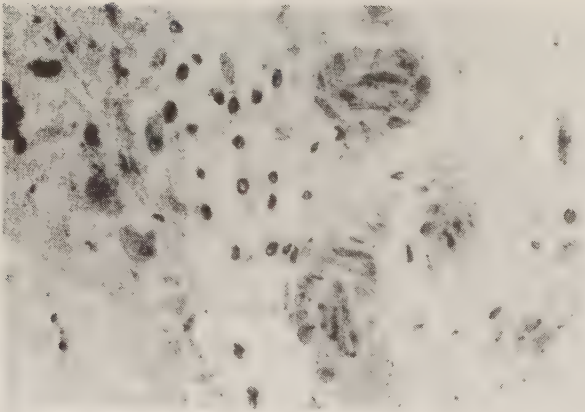


Abb. 12

30-Stunden-Wert (M 199)

Auseinanderweichen der Gefäßwandschichten.
Links Tubulus mit Basallamina.

560 x

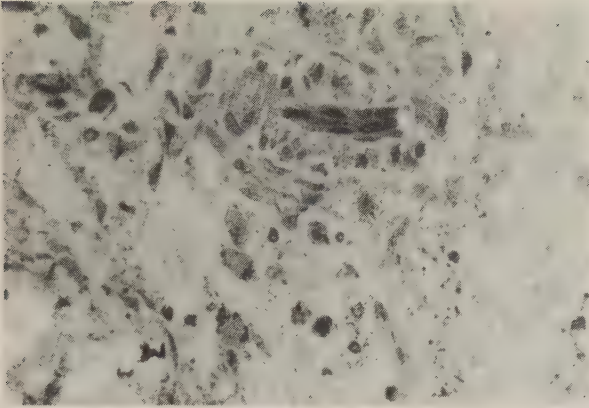


Abb. 13

48-Stunden-Wert (M 199)

Gefäß mit benachbarten, solitären Leydigzellen. Rechts Tubulus mit deutlichen Einfaltungen der M. propria.

560 x

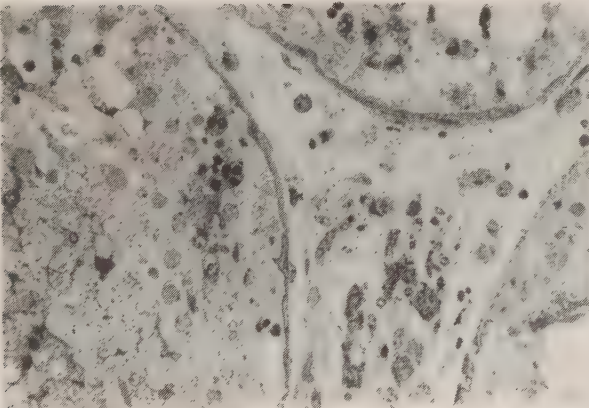


Abb. 14

48-Stunden-Wert (M 199)

Guter Erhaltungszustand älterer Spermatozyten 1. Ordnung. Disseminierte Vakuolenbildung in den Tubuli.

350 x

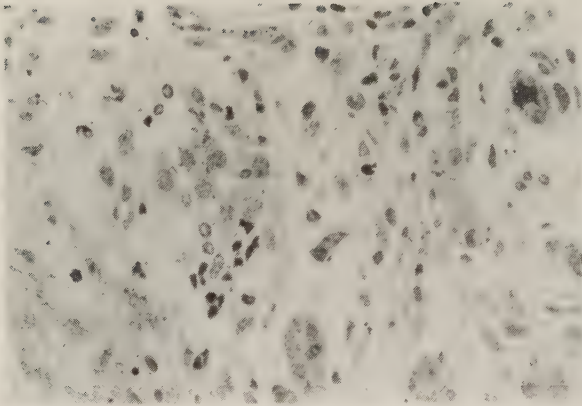


Abb. 15

54-Stunden-Wert (M 199)

Leydigzellen guter Qualität, wahrscheinlich
neugebildet.

560 x

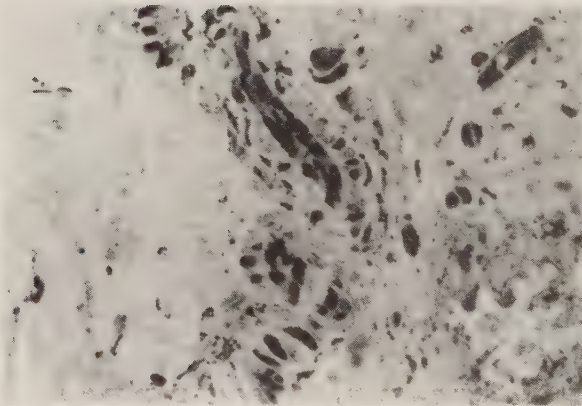


Abb. 16

54-Stunden-Wert (M 199)

Fortgeschrittene Auflösungserscheinungen
eines Gefäßes.

560 x

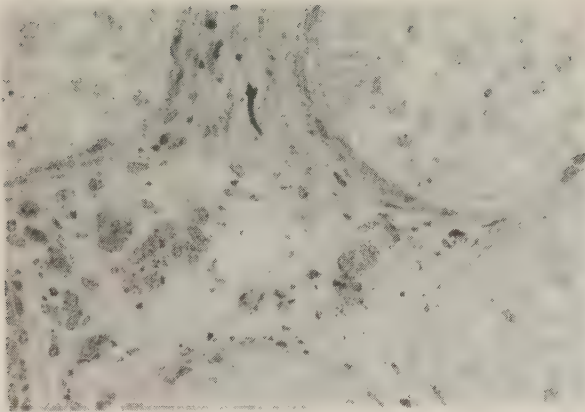


Abb. 17

72-Stunden-Wert (M 199)

Zellproliferation im peritubulären Bereich.
Teilweise noch gut abgrenzbare Sertoli-
zellen in der Tubulusperipherie.
Die Wandung des zentral im Interstitium
gelegenen Lymphgefäßes ist nicht verdickt.

350 x

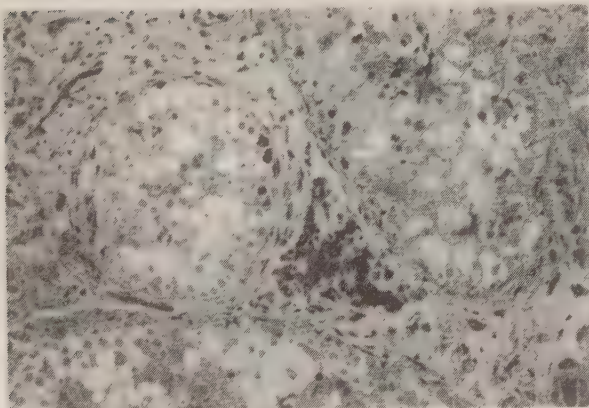


Abb. 18

72-Stunden-Wert (M 199)

Intertubuläre Leydigzellgruppe durchsetzt von
makrophagenartigen, kleinen runden Zellformen.
Tubuli mit unterschiedlich starken Degenerations-
erscheinungen.

224 x

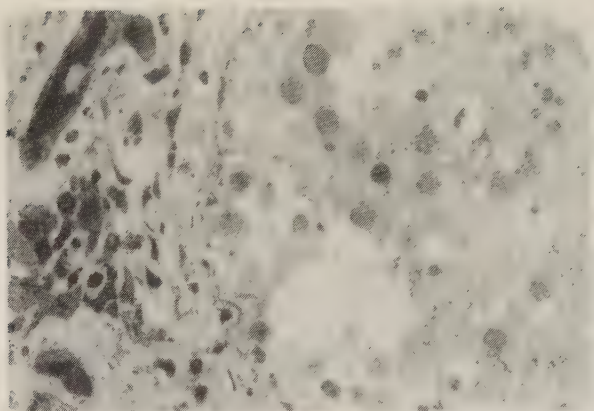


Abb. 19

72-Stunden-Wert (M 199)

Die M. propria ist deutlich gewellt. In den Tubuli langlebige Zellen deren topographische Zuordnung zu den Sertolizellen möglicherweise noch für ein Vorhandensein der Blut-Hoden-Schranke spricht.

560 x

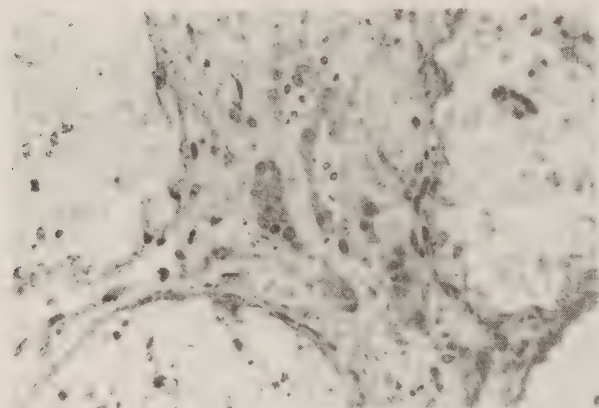


Abb. 20

72-Stunden-Wert (M 199)

Zellreiches Interstitium mit Leydigzell-clustern und zahlreichen makrophagenartigen Zellformen, sowie Fibrozyten bzw. -blaste. Tubuli mit deutlichen Auflösungserscheinungen.

350 x

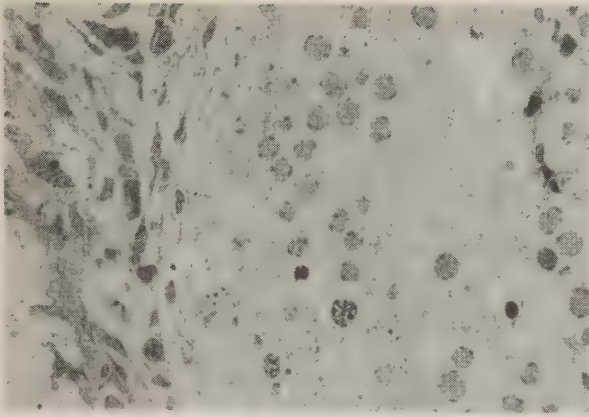


Abb. 21

120-Stunden-Wert (M 199)

Das Keimepithel zeigt noch eine Zellordnung.
Basallamina bereits deutlich alteriert.

560 x

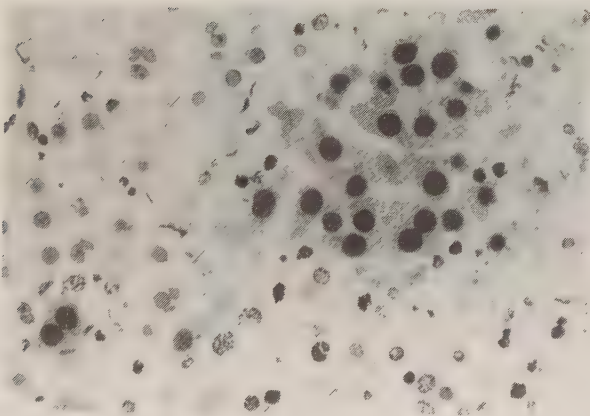


Abb. 22

144-Stunden-Wert (M 199)

Spermatogenesezellen ohne M. propria.

560 x

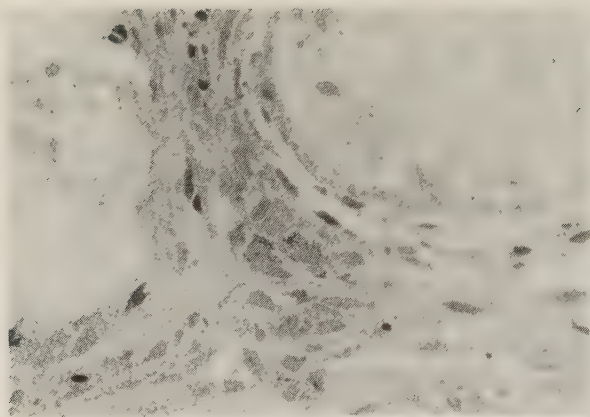


Abb. 23

168-Stunden-Wert (M 199)

Im Interstitium noch Leydigzellen vorhanden.

560 x

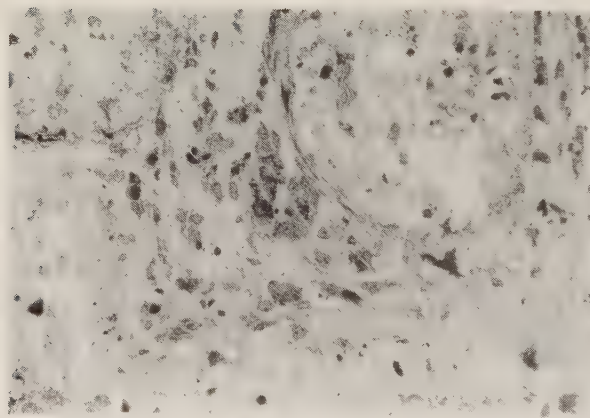


Abb. 24

192-Stunden-Wert (M 199)

Alterierte, aber noch erkennbare Leydigzellen
in Bildmitte.

350 x

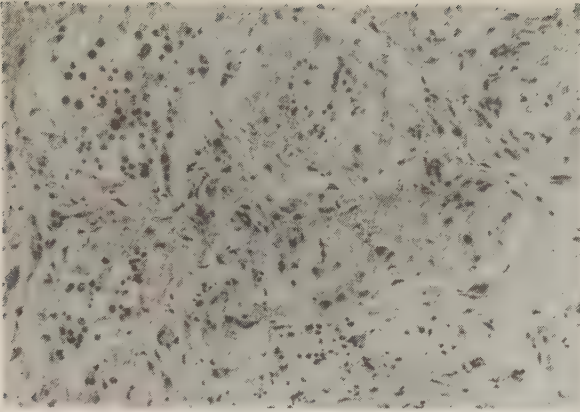


Abb. 25

216-Stunden-Wert (M 199)

Ehemalige Tubuli sind noch abgrenzbar. Nur noch einzelne, ungeordnete Keimzellgruppen vorhanden. Zellverlust überwiegt. Mononukleäre Zellen und Fibrozyten befinden sich jetzt auch innerhalb der M. propria (oben rechts).

224 x

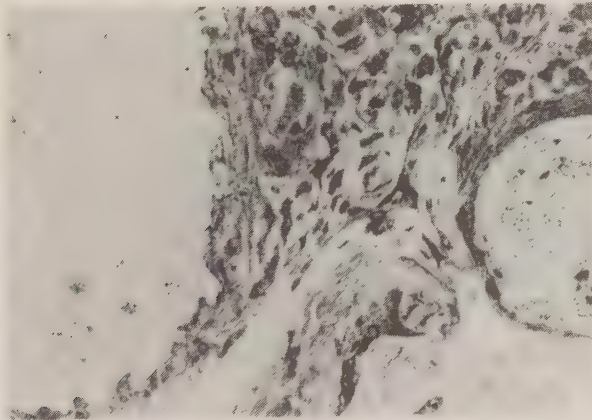


Abb. 26

216-Stunden-Wert (M 199)

Weitgehende Entvölkerung der Tubuli und Einfaltungen der Basallamina. Dedifferenzierung der interstitiellen Zellpopulation in Richtung Fibrozyten.

350 x

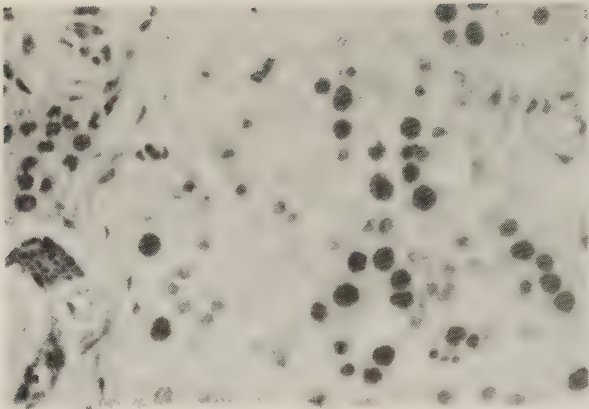


Abb. 27

216-Stunden-Wert (M 199)

Eine sehr heterogene, aber noch identifizierbare Keimzellpopulation (im Gegensatz zu völlig leeren und kollabierten Tubuli an anderer Stelle des Präparates).

Links eine Leydigzellgruppe, die noch zu identifizieren ist. Im Tubulus noch einige Sertolikerne.

560 x

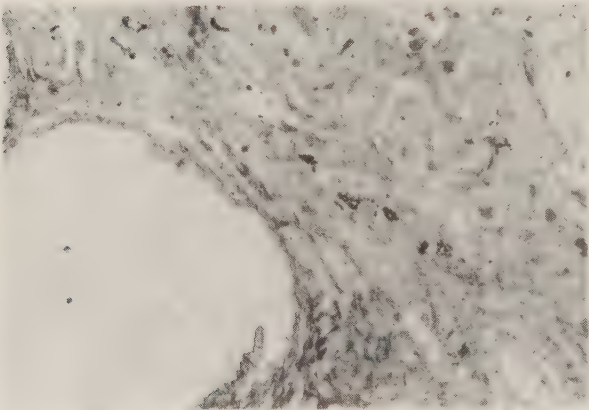


Abb. 28

336-Stunden-Wert (M 199)

Persistierender Tubulus bei Ende des Kulturversuchs. Oben rechts ehemaliges Gefäß.

350 x

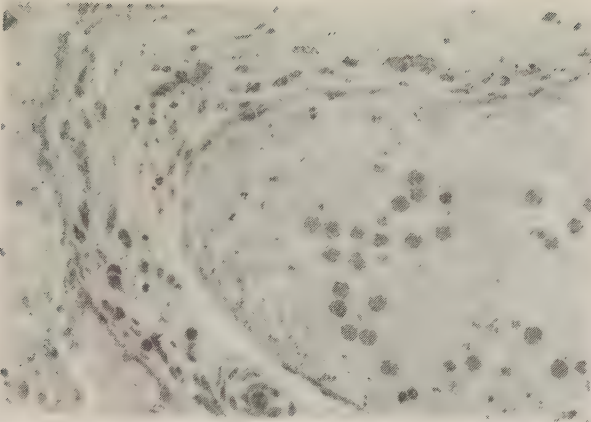


Abb. 29

48-Stunden-Wert (MEM)

Noch deutliche Gliederung im Tubulus.
Das Interstitium ist an Zellen verarmt.

350 x

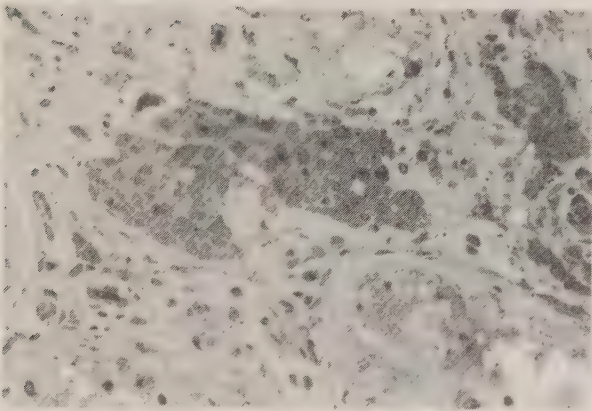


Abb. 30

54-Stunden-Wert (MEM)

Kompakter Leydigzellcluster

350 x

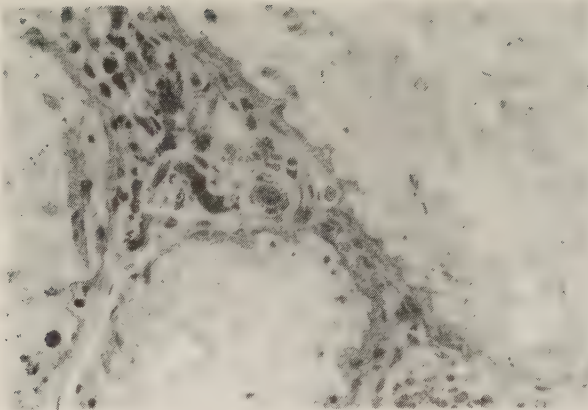


Abb. 31

72-Stunden-Wert (MEM)

Gefaltete Tubuluswände und erkennbare Sertolikerne.

350 x



Abb. 32

72-Stunden-Wert (MEM)

Kollabierter Tubulus, makrophagenartige Zellformen und gequollene Gefäßwände im Querschnitt.

350 x

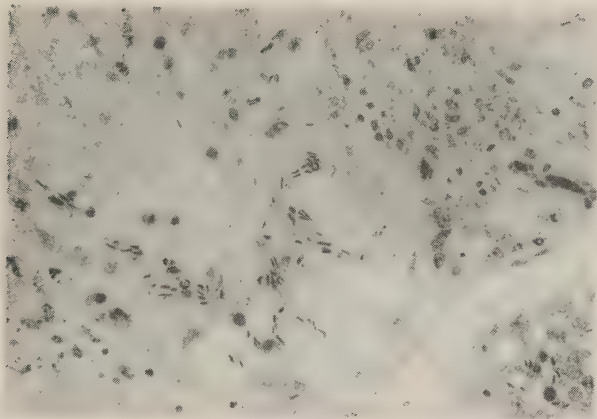


Abb. 33

72-Stunden-Wert (MEM)

Sertolizellkerne

Im Interstitium noch Leydigzellen.

350 x

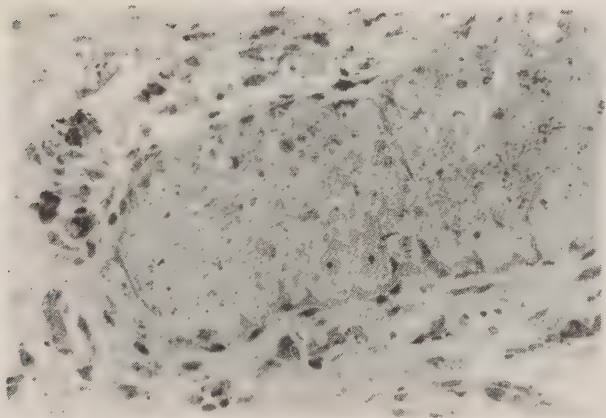


Abb. 34

96-Stunden-Wert (MEM)

Tiefe Einfaltung der Basallamina.

Keimepithel ohne deutliche Schichtung.

350 x

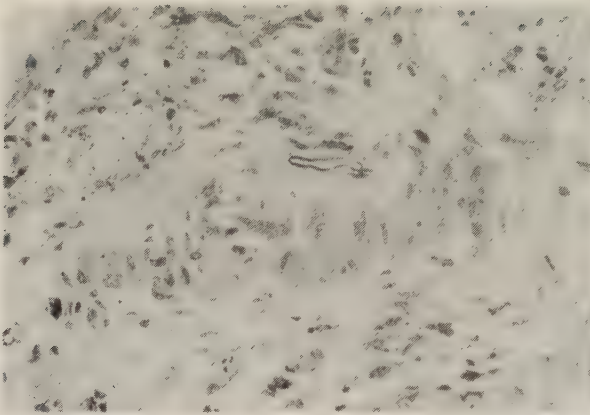


Abb. 35

96-Stunden-Wert (MEM)

Proliferierte Mediazellen sind auseinandergerückt. Das übrige Interstitium ist zellarm.

350 x

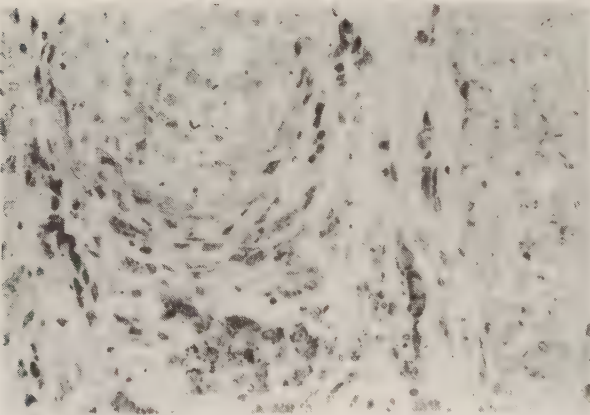


Abb. 36

96-Stunden-Wert (MEM)

Übergangsstadien von Leydigzellen zu Fibroblasten.

350 x

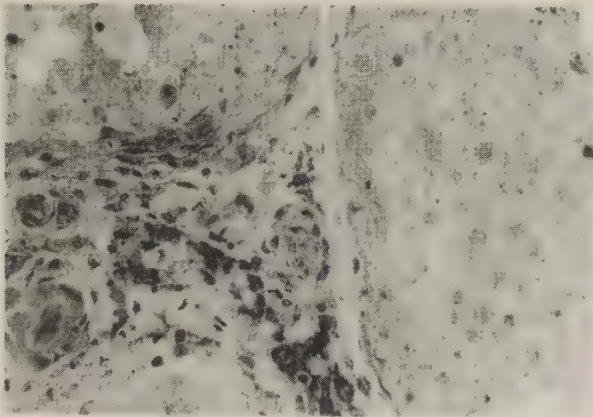


Abb. 37

96-Stunden-Wert (MEM)

Lumenverlust der Gefäße. Rechter Tubulus mit noch deutlicher Schichtung von Spermato gonien und Spermatozyten 1. Ordnung.

350 x

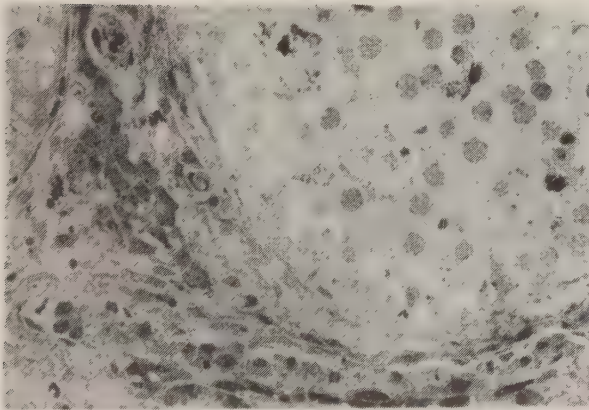


Abb. 38

168-Stunden-Wert (MEM)

Links deutlich degenerativ veränderte Leydigzellgruppe und rundkernige makrophagenartige Zellformen. Innerhalb der Tubuli neben Degenerationerscheinungen auch eine persistierende Zellart mit relativ hellem Cytoplasma.

478 x

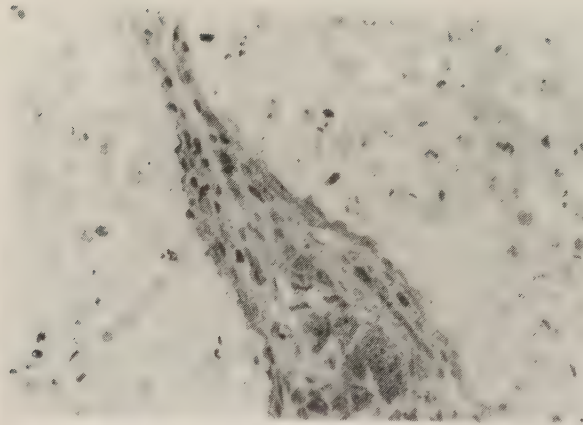


Abb. 39

192-Stunden-Wert (MEM)

Peritubuläre Zellen mit gutem Erhaltungszustand. Keimepithelschichtung fehlt.

350 x

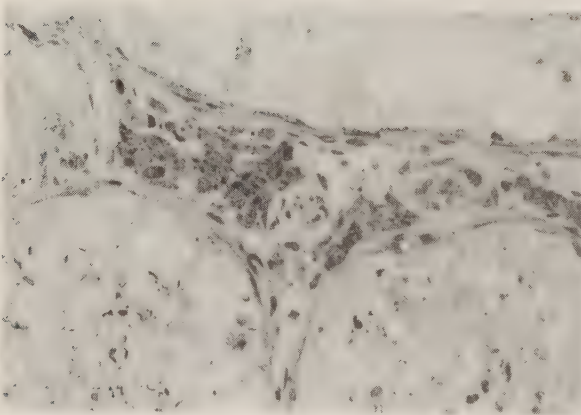


Abb. 40

192-Stunden-Wert (MEM)

Relativ gute Struktur-erhaltung der Leydigzellen.

350 x

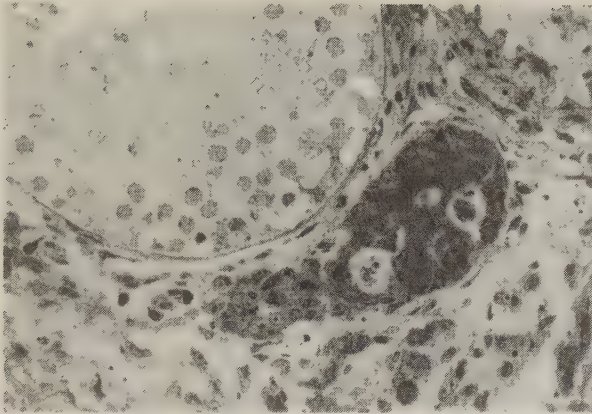


Abb. 41

216-Stunden-Wert (MEM)

Leydigzellgruppe und angrenzender Tubulus.
In der M. propria eine Mitose.

350 x

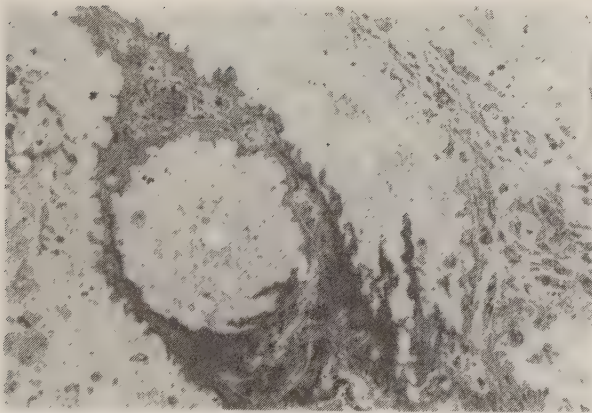


Abb. 42

336-Stunden-Wert (MEM)

Starke Faltung der M. propria. Querschnitts-
fläche der Tubuli gegenüber der Ausgangssitua-
tion stark verkleinert. Im Lumen eine Popu-
lation resistenter Zellformen.

224 x

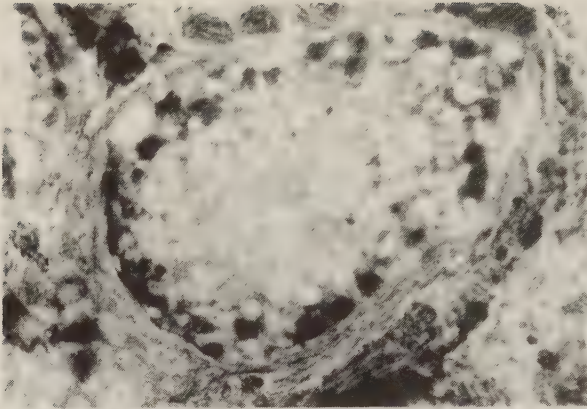


Abb. 43

NADH-T-Red., 48-Stunden-Wert (M 199)

Stark positive basale Komplexe innerhalb
eines Tubulus - wahrscheinlich retrahierte
Sertolizellen.

350 x

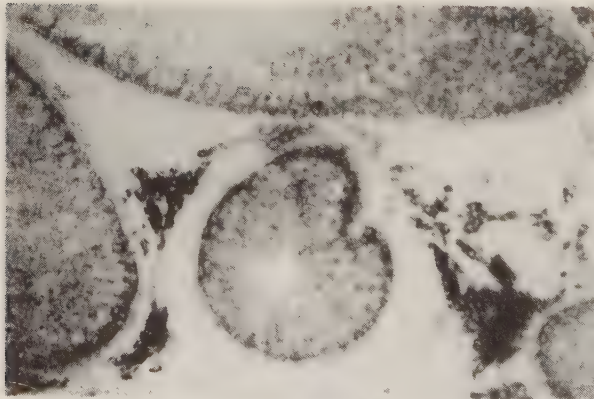


Abb. 44

NADH-T-Red., 0-Stunden-Wert

Sehr kräftige Reaktion in den Leydigzellen,
kräftige R. in den Sertolizellen. Restlicher
Tubulus mittelgradige bis starke Reaktion.

140 x

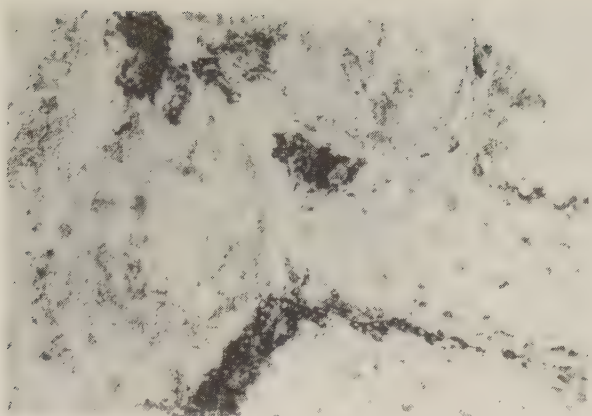


Abb. 45

NADH-T-Red., 48-Stunden-Wert (MEM)

Unterschiedliches Verhalten der Tubuluszellen
ohne deutliche Schichtung. Leydigzellen sehr
kräftig.

140 x

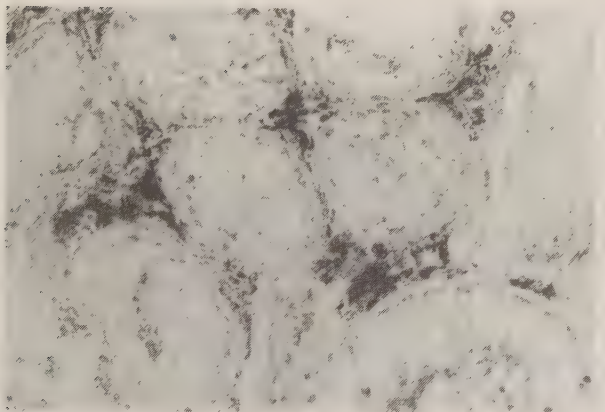


Abb. 46

NADH-T-Red., 192-Stunden-Wert (MEM)

Gute Struktur-erhaltung, markante Leydigzell-
gruppen

140 x

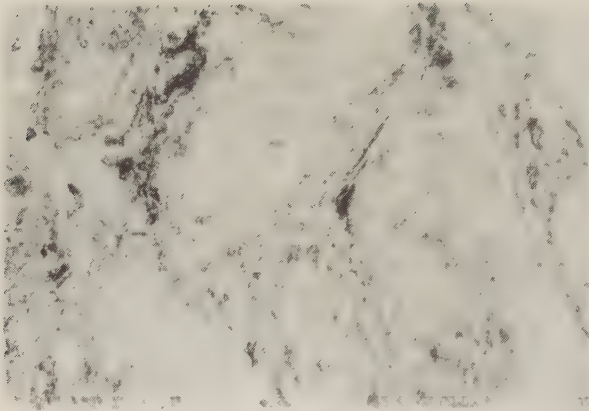


Abb. 47

NADH-T-Red., 216-Stunden-Wert (MEM)
 Noch kräftig reagierende Leydigzellen.
 140 x

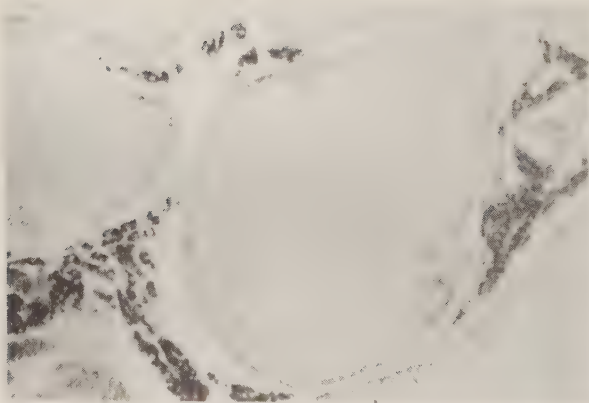


Abb. 48

NADPH-T-Red., 0-Stunden-Wert
 Sehr kräftige Reaktion in den Leydigzellen,
 abgeschwächt in den Sertolizellen (basaler
 Tubulusbereich).

350 x

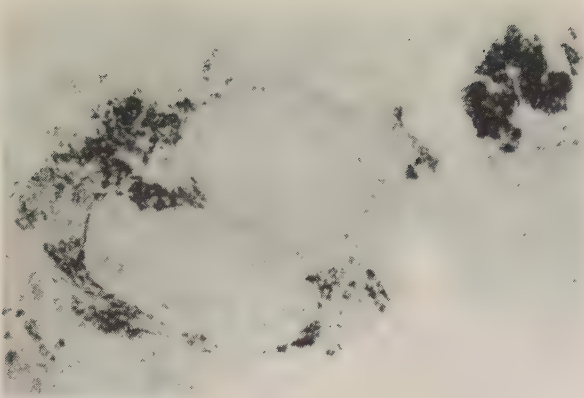


Abb. 49

NADPH-T-Red., 48-Stunden-Wert (M199)

Reaktive Leydigzellgruppen

140 x

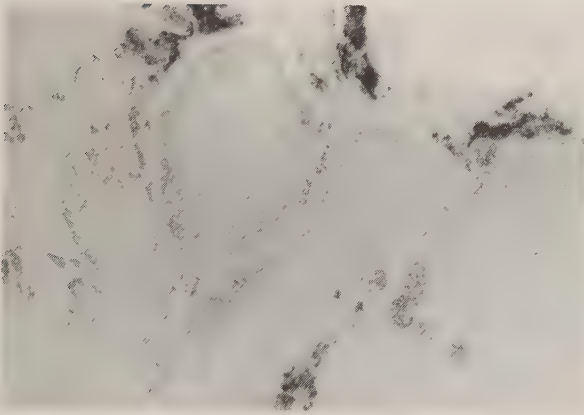


Abb. 50

NADPH-T-Red., 96-Stunden-Wert (MEM)

Leydigzellen nur teilweise kräftig, stellenweise sehr klein. Tubuli unterschiedlich. Gefäßwandung relativ deutlich.

140 x

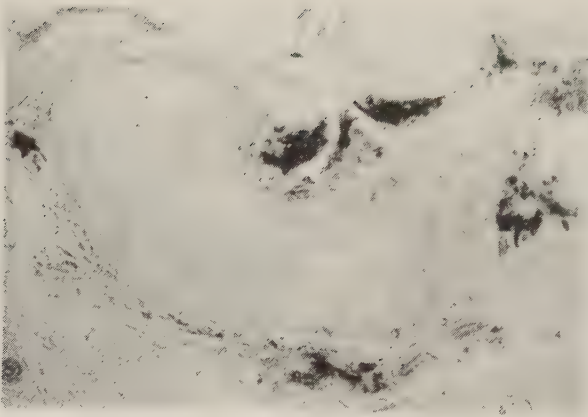


Abb. 51

NADPH-T-Red., 168-Stunden-Wert (MEM)
Positive Leydiggruppen und Gefäßwandzellen

140 x

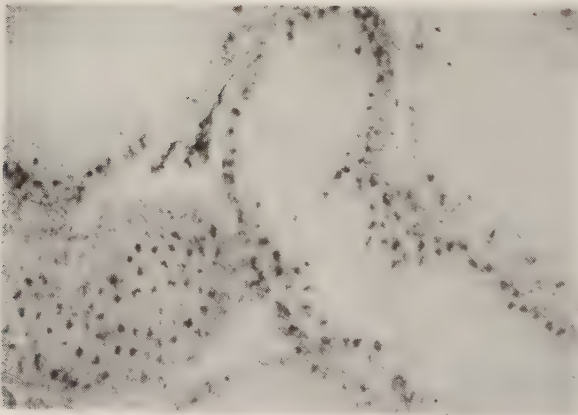


Abb. 52

Sauere Phosphatase, 0-Stunden-Wert
In den Tubuli selektiv kräftige Reaktion
der Sertolizellen. In den Interstitien
positive Zellen (Leydig- und helle Zellen).

140 x

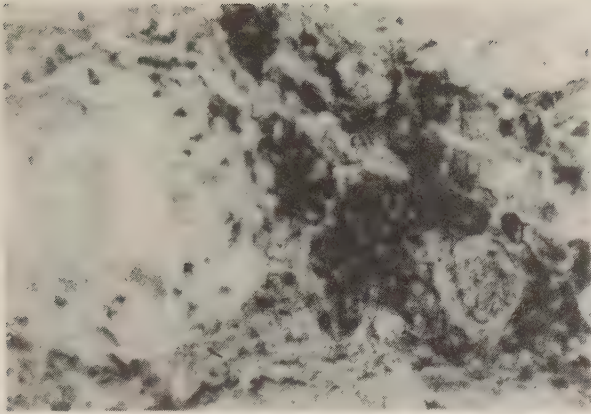


Abb. 53

Sauere Phosphatase, 216-Stunden-Wert (M 199)
Nur diffuse Reaktion in intakten Leydigzell-
gruppen. Daneben positive Einzelzellen.

350 x

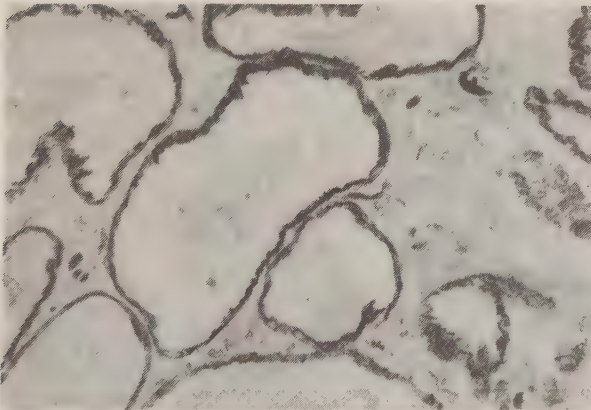


Abb. 54

Alkalische Phosphatase, 24-Stunden-Wert (M 199)
Auch die Intima kleiner Blutgefäße reagiert.

140 x

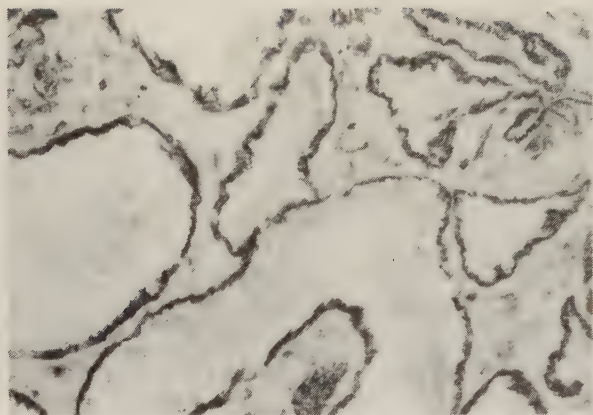


Abb. 55

Alkalische Phosphatase, 96-Stunden-Wert (M 199)

140 x

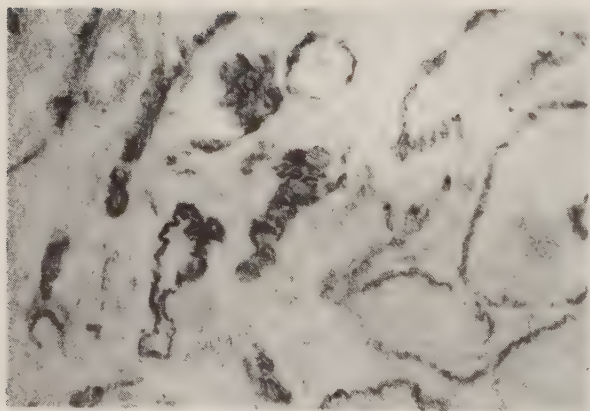


Abb. 56

Alkalische Phosphatase, 120-Stunden-Wert (M 199)

Trotz z. T. erheblicher Schrumpfung der Tubuli - teilweise bis zum Kollaps - bleibt die positiv reagierende M. propria erhalten.

140 x

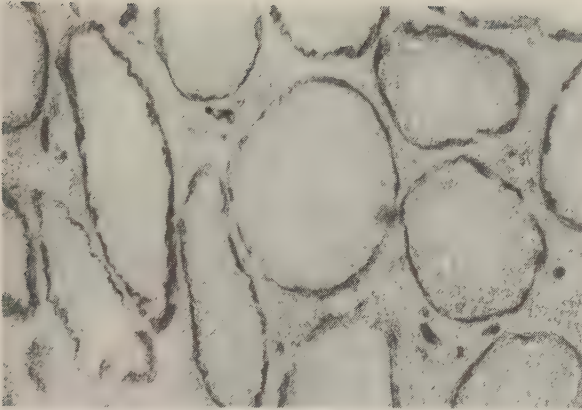


Abb. 57

Alkalische Phosphatase, 24-Stunden-Wert (MEM)
Zelluläre Anteile der M. propria und kleine
Blutgefäße reagieren kräftig.

140 x

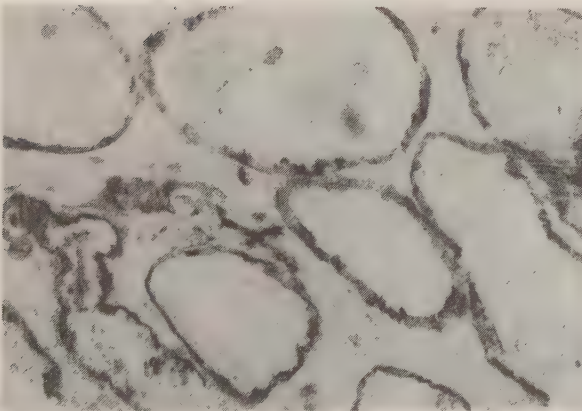


Abb. 58

Alkalische Phosphatase, 96-Stunden-Wert (MEM)
Mit der Tubulusschrumpfung geht eine Verbreite-
rung des positiven Anteiles der M. propria
einher.

140 x

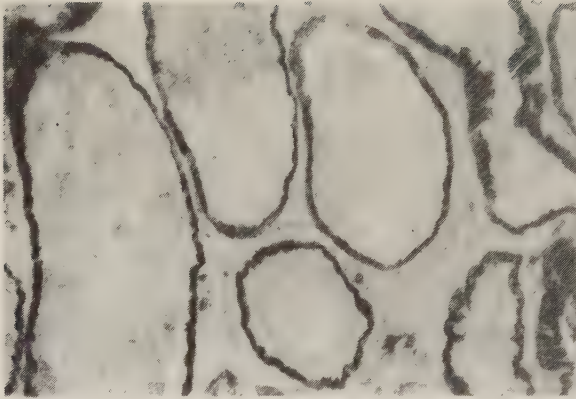


Abb. 59

Alkalische Phosphatase, 144-Stunden-Wert (MEM)
 Sehr kräftige und gleichmäßige positive Reaktion
 in der M. propria. Vor der Schrumpfung treten
 manchmal Kontinuitätsunterbrechungen auf.

140 x

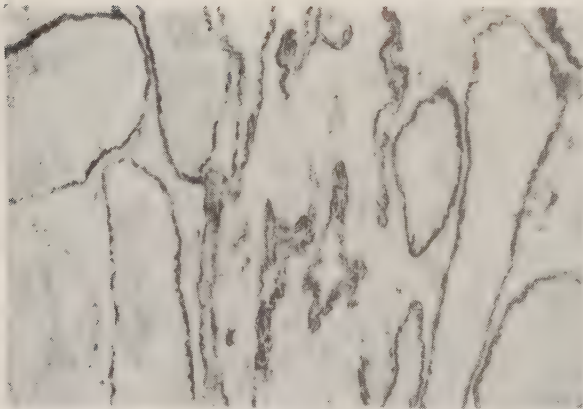


Abb. 60

Alkalische Phosphatase, 192-Stunden-Wert (MEM)
 Starker Kollaps der Tubuluswände.

140 x

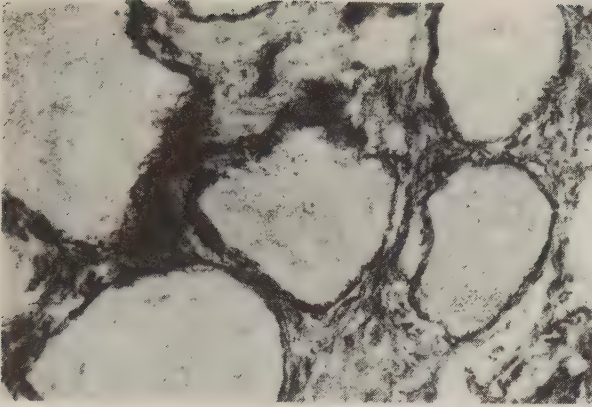


Abb. 61

ATP-ase, 24-Stunden-Wert (MEM)
 Ungleiche Tubulusdurchmesser durch Schrumpfung
 nach längerer Kulturzeit.

140 x

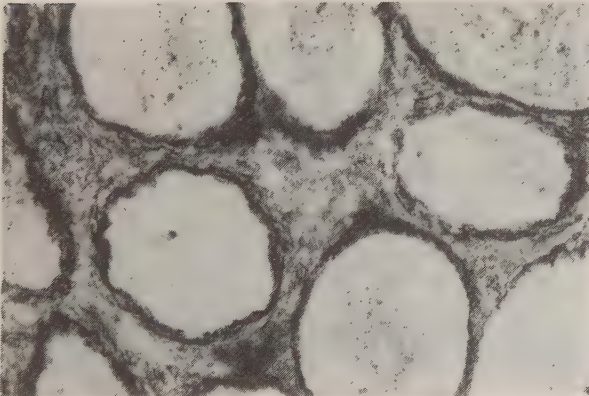


Abb. 62

ATP-ase, 120-Stunden-Wert (MEM)
 Zunahme der Reaktionsintensität in den
 Gefäßwänden.

140 x

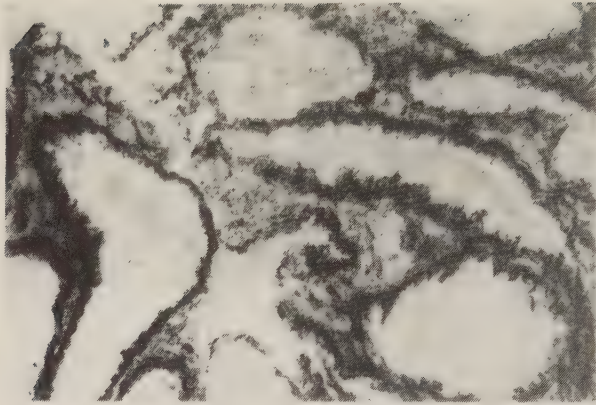


Abb. 63

ATP-ase, 168-Stunden-Wert (MEM)
Einstülpungen der M. propria
140 x

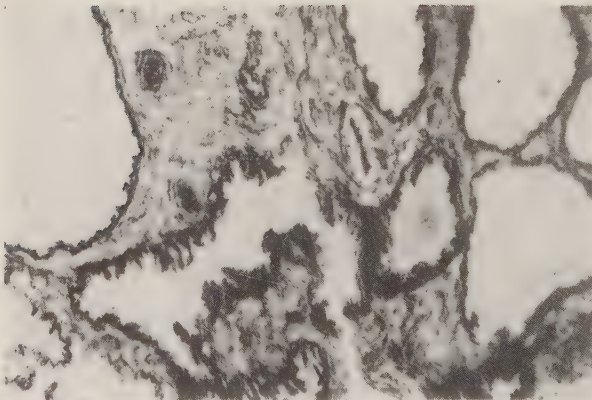


Abb. 64

ATP-ase, 192-Stunden-Wert (MEM)
Stark gefaltete M. propria. Endothel der
Gefäße kräftig. Im Bindegewebe nur diffuse
Reaktion, Keimzellen negativ.
140 x

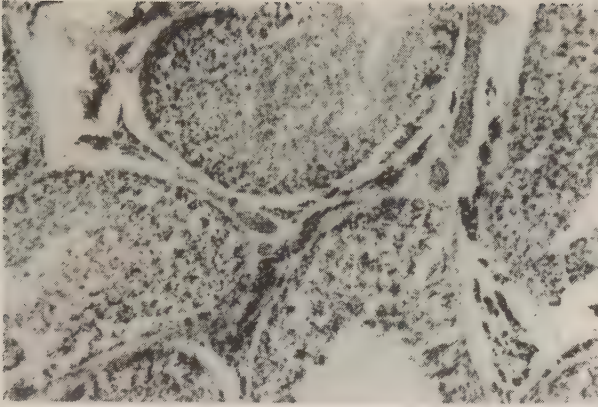


Abb. 65

Succinatdehydrogenase, 0-Stunden-Wert

Starke Reaktion in den Leydigzellen, deutliche
Reaktion in der Gefäßwand und im Tubulus.
M. propria nur schwach.

140 x

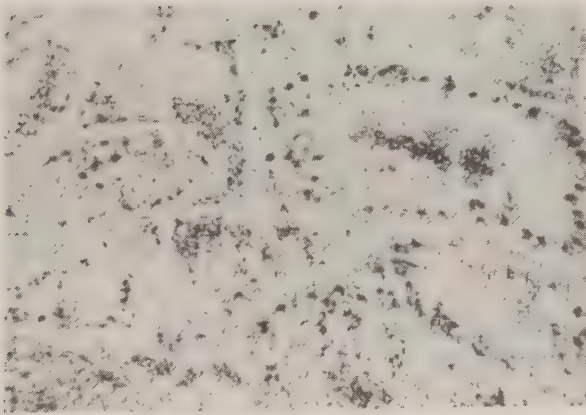


Abb. 66

Succinatdehydrogenase, 48-Stunden-Wert (M 199)

Regelmäßig angeordnete basale Tubuluskomplexe
reagieren sehr kräftig. Positive Leydigzell-
gruppen sind deutlich verkleinert.

140 x

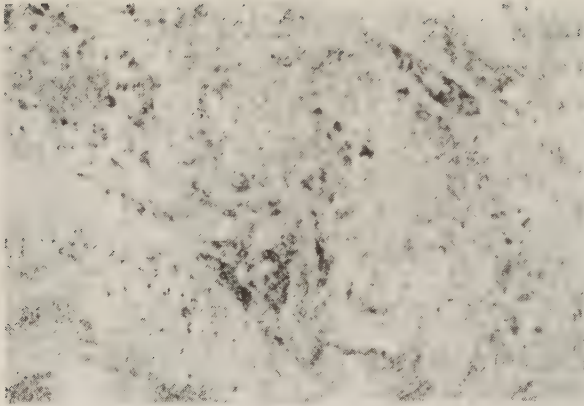


Abb. 67

Succinatdehydrogenase, 168-Stunden-Wert (NEM)
Nur wenige Tubuluszellen reagieren kräftig.
Heterogenes Verhalten der Leydigzellen.

140 x



Abb. 68

Succinatdehydrogenase, 216-Stunden-Wert (M 199)
Tubulusreaktion nahezu vollständig negativ.
Leydigzellen partiell stark positiv.

140 x

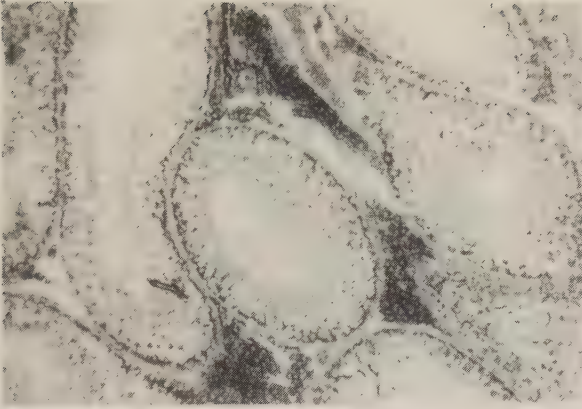


Abb. 69

Lactatdehydrogenase 0-Stunden-Wert

Kräftige Reaktion in den Leydigzellen und Sertolizellen.

90 x

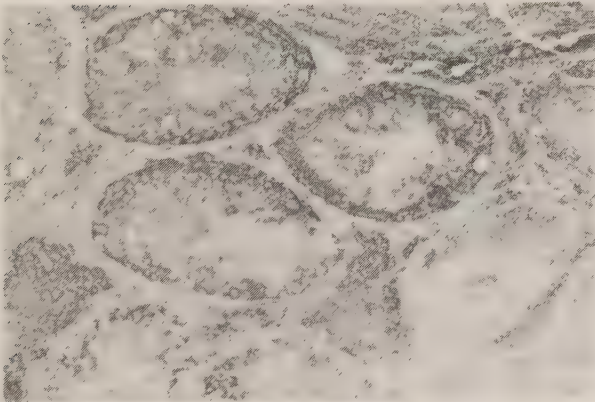


Abb. 70

Lactatdehydrogenase, 24-Stunden-Wert (MEM)

Die Tubuli sind geschrumpft und wirken in ihrer Reaktion deshalb kompakter.

140 x

LITERATURVERZEICHNIS

- Amann, R. P. und Almquist, J. O. (1962):
J. Dairy Sci. 45, 774-776
- Bergh, A. (1982): Local differences in Leydig cell morphology in the adult rat testis: evidence for a local control of Leydig cells by adjacent seminiferous tubules.
Int. J. Androl. 5, 325-330
- Bergh, A. (1983): Paracrine regulations of Leydig cells by the seminiferous tubules.
Int. J. Androl. 6, 57-65
- Bergh, A. and Damber, J.-E. (1984):
Local regulation of Leydig cells by the seminiferous tubules. Effect of short-term cryptorchidism.
Int. J. Androl. 7, 409-418
- Bressler, R.S. and Ross, M. H. (1972):
Differentiation of peritubular myoid cells of the testis: Effects of intratesticular implantation of newborn mouse testes into normal and hypophsectomized adults.
Biol. Reprod. 6, 148-159
- Christensen, A. K. and Gillim, W. (1969):
The correlation of fine structure and function in steroid-secreting cells, with emphasis on those of the gonads.
In: Mc Kerns, K.W. (ed.): The Gonads, Appleton-Century-Crofts, New York, 415-488
- Christensen, A.K. (1975): Leydig cells
In: Hamilton, D.W. Greep, R. O. (eds.)
Handbook of Physiology, Sect. 7, Vol. 5
Williams and Wilkins, Baltimore, 57 - 94
- Cunha, G. R., Reese, B. A. and Sekkingstad, M. (1980):
Induction of nuclear androgen-binding sites in epithelium of the embryonic urinary bladder by mesenchyme of the urogenital sinus of embryonic mice.
Endocrinology 107, 1767-1770

- Davis, H. R., Vesselinovitch, D. and Wissler, R. W. (1984):
Histochemical detection and quantification
of macrophages in rhesus and cynomolgus
monkey atherosclerotic lesions.
J. Histochem. Cytochem. 32, 1319-1327
- de Kretser, D. M. (1982): Sertoli cell - Leydig cell inter-
action in regulation of testicular function.
Int. J. Androl Suppl. 5, 11-17
- Dias, J. A. and Reichert, L. E. (1984)
Evidence for a high molecular weight
follicle-stimulating hormone binding
inhibitor in bovine testis.
Biol. Reprod. 31, 975-983
- D'OCCHIO, M. J., Schambacher, B. D. and Kinder, J. E. (1984):
In vitro testosterone secretion by testicular
tissue from young bulls and the effects of
chronic and acute exposure to Estradiol - 17 β .
J. anim. Sci. 58, 949-954
- Dostal, S. (1986): Pers. Mitteilung
- Dym, M. and Fawcett, D.W. (1970):
The blood-testis barrier in the rat and the
physiological compartmentation of the semi-
niferous epithelium.
Biol. Reprod. 3, 308-326
- Fawcett, D. W., Heidger, P. J., Leak, L. V. (1969):
The lymph-vascular system of the interstitial
tissue of the testis as revealed by electron
microscopy.
J. Reprod. Fert. 19, 109-111
- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., Flores, M. N. (1973):
Comparative observations on intertubular
lymphatics and the organization of the inter-
stitial tissue of the mammalian testis.
Biol. Reprod. 9, 500-532
- Frankel, A. I., Mock, E. J. and Chapman, J. C. (1984):
Hypophysectomy and hemivasectomy can
inhibit the testicular hemicastration
response of the mature rat.
Biol. Reprod. 30, 804-808

- Fröhlich, W. (1980): In vitro Untersuchungen zur Beeinflussung von Regulationsmechanismen in testikulären Gewebesuspensionen immaturer Ratten. Inaug-Diss. FU Berlin
- Ganjam, V. K., Amann, R. P. (1976): Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. *Endocrinology* 99, 1618-1630
- Hall, P. F. and Mita, M. (1984): Influence of follicle stimulating hormone on glucose transport by cultured Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 31, 863-869
- Hall, P. F., Kew, D. and Mita, M. (1985) The influence of temperature on the functions of cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 116, 1926-1932
- Halle, W. (1976): Zell- und Gewebezüchtungen bei Tieren 1. Aufl., G. Fischer Verlag Stuttgart
- Heptner, V. G. und Naumov, N. P. (1966): Die Säugetiere der Sowjetunion Bd. 1, G. Fischer Verlag Stuttgart
- Heuberger, B., Fitzka, J., Wasner, G. and Kratochura, K. (1982): Induction of androgen receptor formation by epithelium-mesenchyme interaction in embryonic mouse mammary gland. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 79, 2957-2961
- Hoffer, A. P. and Hinton, B. T. (1984) Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol in its integrity. *Biol. Reprod.* 30, 991-1004
- Hooker, C. W. (1948): The biology of the interstitial cells of the testis. *Recent Prog. Horm. Res.* 3, 173-178
- Hooker, C. W. (1970): The intertubular tissue of the testis. In: Johnson, A.D., Gomes, W. R., Van Demark, N. C. (eds.): *The Testis* Acad. Press, New York, 483-537

- Huhtaniemi, I. T., Clayton, R. N. and Catt, K. J. (1984):
Gonadotropin-releasing hormone against
analog-induced steroidogenic lesion in the
neonatal rat testis.
Evidence for direct gonadal action.
Endocrinology 115, 233-238
- Hutson, J. C. and Stocco, D. M. (1978):
Specificity of hormone-induced responses of
testicular cells in culture.
Biol. Reprod. 19, 768-772
- Hutson, J. C. and Stocco, D. M. (1981):
Peritubular cell influence of the efficiency
of androgen-binding protein secretion by
Sertoli cells in culture.
Endocrinology 108, 1362-1368
- Isomaa, V., Pajunen, A. E. I., Bardin, C. W., Jänne, O. A.
(1982): Nuclear androgen receptors in the
mouse kidney: Validation of a new assay.
Endocrinology 111, 833-843
- Isomaa, V., Parvinen, M., Jänne, O. A. and Bardin C. W.
(1985): Nuclear androgen receptors in different
stages of the seminiferous epithelial
cycle and the interstitial tissue of rat
testis.
Endocrinology 116, 132-137
- Jutte, N. H. P. M., Eikvar, L., Levy, F. O. and Hansson, V.
(1985): Metabolism of palmitate in cultured
rat Sertoli cells.
J. Reprod. Fertil. 73, 497-503
- Kegel, E. (1985): Histologische und histochemische Untersuchungen an in vitro kultiviertem menschlichen Eileiterepithel.
Inaug-Diss. Regensburg
- Kerr, J. B. and Sharpe, R. M. (1985):
Follicle-stimulating hormone induction of
Leydig cell maturation.
Endocrinology 116, 2592-2604
- Kinoshita, Y., Higashi, Y., Winters, S. J., Oshima, H. and
Troen, P. (1985): An analysis of the age-related decline in testicular steroidogenesis
in the rat.
Biol. Reprod. 32, 309-314

- Kitos, P. A., Sinclair, R. and Waymouth, C. (1962):
Glutamine metabolism by animal cells
growing in a synthetic medium.
Exp. Cell Res. 27, 307-316
- Kormano, M. (1967): Dye permeability and alkaline
phosphatase activity of testicular capilla-
ries in the postnatal rat.
Histochem. 9, 327-338
- Kormano, M. (1967): An angiographic study of the testicular
vasculature in the postnatal rat.
Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 126, 138-153
- Küst, D. und Schätz, F. (1977):
Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren.
5. Aufl., F. Enke Verlag Stuttgart
- Leblond, C. P. and Clermont, Y. (1952):
Definition of the stages of the cycle of
the seminiferous epithelium in the rat.
Ann. NY Acad. Sci. 55, 548-560
- Lengfelder, K. D. (1978): Elektronenmikroskopische Unter-
suchungen zur Differenzierung männlicher
Keimzellen des Rindes.
Inaug.-Diss. München
- Lehninger, A. L. (1977): Biochemie
2. Aufl., Verlag Chemie Weinheim New York
- Leidl, W. (1980): Einführung in die künstliche Besamung der
Haustiere, Teil 1 und 2, und Sterilität der
männlichen Haustiere.
Skriptum aus dem Lehrstuhl für Physiologie
und Pathologie der Fortpflanzung, insbeson-
dere Andrologie und künstliche Besamung,
Univ. München
- Lengerken v., H. und Lengerken v., E. (1955)
Ur, Hausrind und Mensch,
Deutsche Akademie der Landw. Wissenschaften
Berlin
- Leung, K.-P., Russel, S. W., Le Blanc, P. A. and Caballero,
S. (1985): Heterogeneity among macrophages
cultured from mouse bone marrow.
Cell Tissue Res. 239, 693-701
- Lin, TU (1984): Mechanism of action of gonadotropin releasing
hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis.
J. Androl. 5, 193-200

- Lin, TU (1984): Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone-stimulated Leydig cell steroidogenesis. *J. Androl.* 5, 201-205
- Lino, J., Baranao, S. and Hammond, J. M. (1985): Multihormone regulation of steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells: Studies in serum-free medium. *Endocrinology* 116, 2143-2151
- Lording, D. W. and de Kretser, D. M. (1972): Comparative ultrastructural and histochemical studies on the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J. Reprod. Fertil.* 29, 261-269
- Magalhaes, M. M. and Magalhaes, M. C. (1980): Effects of orchidectomy on the adrenal macrophage system. *Anat. Rec.* 198, 209-218
- Magalhaes, M. M. and Magalhaes, M. C. (1984): Effects of orchidectomy and estradiol administration on the adrenal macrophage system of the rat. *Cell Tissue Res.* 8, 559-564
- Magre, S. and Jost, A. (1984): Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. *Developmental Biol.* 81, 7831-7834
- Mather, J. P., Saez, J. M. and Haour F. (1981): Primary cultures of Leydig cells from rat, mouse and pig: Advantages of porcine cells for the study of gonadotropin regulation of Leydig cell function. *Steroids* 38, 35-44
- Mc Carthy, M. S., Convey, E. M. and Hafs, H. D. (1979): Serum hormonal changes and testicular response to LH during puberty in bulls. *Biol. Reprod.* 20, 1221-1227
- Michel, G. (1972): *Kompndium der Embryologie der Haustiere.* G. Fischer Verlag Stuttgart
- Nakamura, M., Okinaga, S. and Arai, K. (1984): Metabolism of pachytene primary spermatocytes from rat testis: Pyroid maintenance of adenosine triphosphate level. *Biol. Reprod.* 30, 1187-1197

- Nakhla, A. M., Mather, J. P., Jänne, O. A. and Bardin, C. W. (1984): Estrogen and androgen receptors in Sertoli, Leydig, myoid and epithelial cells: Effects of time in culture and cell density.
Endocrinology 115, 121-128
- Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E. (1975):
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere
Band II, 3. Aufl., Verlag Paul Parey Berlin
und Hamburg
- Oko, R. and Hrudka, F. (1984):
Comparison of the effects of gossypol,
estradiol - 17 β and Testosterone.
Compensation on male rat reproductive organs.
Biol. Reprod. 30, 1198-1207
- Parvinen, M. (1973): Observations on freshly isolated and accurately identified spermatogenic cells in the rat. Early effects of heat and short-time experimental cryptorchidism.
Virchows Arch. Cell Pathol. 13, 38-47
- Parvinen, M. (1982): Regulation of the seminiferous epithelium.
Endocr. Rev. 4, 404-413
- Parvinen, M., Nikula H. and Huhtaniemi I. (1984):
Cyclic regulation of rat Leydig cell testosterone production by seminiferous tubules.
Mol. Cell Endocrinology 37, 331 - 342
- Patsavoudi, E., Magre, S., Castahior, M., Scholler, R. and Jost, A. (1985): Dissociation between testicular morphogenesis and functional differentiation of Leydig cells.
Endocrinology 105, 235-238
- Risbridger, G. P., Kerr, J. P. and de Kretser, D. M. (1981):
An evaluation of Leydig cell function and gonadotropin binding in unilateral and bilateral cryptorchidism: evidence for local control of Leydig cell function by the seminiferous tubules.
Biol. Reprod. 24, 534-540
- Rolle, M. und Mayr, A. (1978):
Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
4. Aufl., Enke Verlag Stuttgart

- Rommerts, F. F. G., Molenaar, R., Hoogerbrugge, J. W. and van der Molen, H. J. (1984): Development of adenosine responsiveness after isolation of Leydig cells. Biol. Reprod. 30, 842-847
- Roosen-Runge, E. C. and Anderson, D. (1959): The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. Acta Anat. 37, 125-137
- Rosenberger, G. (1977): Die klinische Untersuchung des Rindes. 2. Aufl., Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg
- Rosenberger, G. (1978): Krankheiten des Rindes. 2. Aufl., Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg
- Russell, L. D. (1978): The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum tracer study. Anat. Rec. 190, 99-112
- Russell, L. D. (1983): Normal testicular structure and methods of evaluation under experimental disruptive conditions. In: Clarkson, T. W., Nordberg, G. F. and Sager, P. R. (eds.): Reproductive and developmental toxicity of metals. Plenum Press, New York
- Sacks, P. G., Pames, S. M., Price, J. C., Risemberg, H., Goldstein, J. C., Marko, M. and Parsons, D. F. (1985): In vitro modulation of differentiation by calcium in organ cultures of human and murine epithelial tissue. In vitro cell. developmental Biol. 21, 99-107
- Scheubeck, M., Sinowatz, F. und Wrobel, K.-H. (1984): Zur Chromatinkondensation bei der Spermiogenese (Bos taurus). Verh. anat. Ges. 78, 311-312
- Scheubeck, M. (1984): Untersuchungen zur Spermatidendifferenzierung des Rindes (Bos taurus L.) Inaug.-Diss. Regensburg
- Scheunert, A. und Trautmann, A. (1976): Lehrbuch der Veterinärphysiologie 6. Aufl., Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg

- Schwark, H. J. (1983): Rinderzucht
1. Aufl., VEB Deutscher Landw. Verlag Berlin
- Setchell, B. P. (1967): The blood-testicular fluid barrier
in sheep.
J. Physiol. 189, 63-65
- Setchell, B. P. (1978): The mammalian testis.
Edit. Paul Elek, London
- Sharpe, R. M. (1984): Intratesticular factors controlling
testicular function.
Biol. Reprod. 30, 29-49
- Sharpe, R. M. and Bartlett, J. M. S. (1985):
Intratesticular distribution of testosterone
in rats and the relationship to the concentrations of a peptide that stimulates testosterone secretion
J. Reprod. Fertil. 73, 223-236
- Sinowatz, F., Frieß, A. E. und Wrobel, K.-H. (1982):
Histochemische, zytochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen zur Spermiogenese.
Acta histochemica, Suppl. Band 25, 137-146
- Sinowatz, F., Scheubeck, M., Wrobel, K.-H. and Zwack, M.
(1983): Histochemical localization and quantification of glucose-6-phosphate dehydrogenase in bovine Leydig cells.
Histochem. 15, 831-844
- Sinowatz, F., Wrobel, K.-H., Fischerleitner, F. und Schilling, E. (1983): Morphologische Aspekte der postnatalen Hodendifferenzierung.
Wiener Tierärztl. Monatsschrift, 6/7, 194-197
- Sinowatz, F. and Friess, A. E. (1983):
Localization of lectin receptors on bovine epididymal spermatozoa.
Using a colloidal gold technique.
Histochem. 79, 335-344
- Sinowatz, F., Schilling, E., Fischerleitner, F. und Wrobel K.-H. (1984): Zur Morphologie der postnatalen Entwicklung des Rinderhodens.
Tierärztliche Umschau 12, 1023-1025

- Stevens, R. W. and Steinberger, E. (1983):
Effect of testosterone on quantitative maintenance of spermatogenesis in hypophysectomized rats.
In: Program and abstracts of U.S. Endocrin Society, Abst. No 377
- Suoranta, H. (1971): Changes in the small blood vessels of the adult human testis in relation to age and to some pathological conditions.
Virchows Arch. 352, 165-181
- Suzuki, N. and Garbers, D. L. (1984):
Stimulation of sperm respiration rates by Speract and Resact at alkaline extracellular pH.
Biol. Reprod. 30, 1167-1174
- Tabone, E., Benahmed, M., Reventos, J. and Saez, J. M. (1984): Interactions between immature porcine Leydig and Sertoli cells in vitro.
Cell Tissue Res. 237, 357-362
- Tsai-Morris, C. H., Aquilano, D. R. and Dufan, M. L. (1985):
Gonadotropic regulation of aromatase activity in the adult rat testis.
Endocrinology 116, 31-37
- Tung, P. S. and Fritz, I. B. (1980):
Interactions of Sertoli cells with myoid cells in vitro.
Biol. Reprod. 23, 207-217
- Tung, P. S., Skinner, M. K. and Fritz, I. B. (1984):
Fibronectin synthesis is a marker for peritubular cell contaminants in Sertoli cell enriched cultures.
Biol. Reprod. 30, 199-211
- Turner, T. T., Jones, C. E., Howards, S. S., Ewing, L. L., Zegaye, B. and Gunsalus, G. L. (1984):
On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa.
Endocrinology 115, 1925-1932
- Verhoeven, G. (1980): Androgen receptor in cultured interstitial cells derived from immature rat testis.
J. Steroid. Biochem. 13, 469-474

- Vitale, R., Fawcett, D. W. and Dym, M. (1973):
The normal development of the blood-testis
barrier and the effects of clomiphene and
estrogene treatment.
Anat. Rec. 176, 333-344
- Wasner, G., Hennermann, I., Kratochvil, K. (1983):
Ontogeny of mesenchymal androgen receptors
in the embryonic mouse mammary gland.
Endocrinology 113, 1771-1780
- Wright, W. W. and Franke, A. I. (1979):
Endogenous androgen concentrations in nuclei
isolated from seminiferous tubules of mature
rat testis.
J. Steroid. Biochem. 10, 633-640
- Wrobel, K.-H. und Kühnel, W. (1968):
Enzymhistochemie am Hoden der Haussäugetiere.
I. Oydoreduktasen im Hoden von Ziege und
Schwein.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 81, 86-90
- Wrobel, K.-H., Mademann, R. and Sinowatz, F. (1979):
The lamina propria of the bovine seminiferous
tubule.
Cell Tissue Res. 202, 357-377
- Wrobel, K.-H., Sinowatz, F. and Mademann, R. (1981):
Intertubular topography in the bovine testis.
Cell Tissue Res. 217, 289-310
- Wrobel, K.-H., Sinowatz, F. and Mademann, R. (1982):
The fine structure of the terminal segment
of the bovine seminiferous tubule.
Cell Tissue Res 225, 29-44
- Wrobel, K.-H., und Sinowatz, F. (1982):
Aktuelle Probleme der funktionellen Morphologie
des Rinderhodens.
Tierärztl. Praxis 10, 35-47
- Wrobel, K.-H., Schilling, E. und Dostal, S. (1984):
Morphologische Besonderheiten an den Hoden-
zwischenzellen des Rindes.
Verh. 3. Jugoslaw. Endokrinol. Kongr. NoviSad
(in Druck)

- Yee, J. B. and Hutson, J. C. (1983):
Testicular macrophages: Isolation, characterization and hormonal responsiveness.
Biol. Reprod. 29, 1319-1326
- Yee, J. B. and Hutson, J. C. (1985):
In vitro effects of follicle-stimulating hormone on testicular macrophages.
Biol. Reprod. 32, 880-883
- Yee, J. B. and Hutson, J. C. (1985):
Effects of testicular macrophage-conditioned medium on Leydig cells in culture.
Endocrinology 116, 2682-2684
- Yee, J. B. and Hutson, J. C. (1985):
Biochemical consequences of follicle-stimulating hormone binding to testicular macrophages in culture.
Biol. Reprod. 32, 872-879

Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. K.-H. Wrobel
für die Überlassung des Themas und die
jederzeit gewährte Unterstützung,
Frau M. Schimmel für die technische Mitarbeit
und Prof. Dr. B. Vollmerhaus für die Ermöglichung
des Einreichens über den Lehrstuhl für
makroskopische Anatomie der Tiere der
Universität München.

Lebenslauf

Am 17. Dezember 1953 wurde ich als Sohn des Schweißers Josef Weigl und seiner Ehefrau Anna, geb. Turban, in Mantel in der Oberpfalz geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule meines Heimatortes und anschließend das Augustinus-Gymnasium in Weiden, wo ich 1973 das Abitur ablegte.

Es folgten 15 Monate Wehrdienst.

Nach meiner Entlassung studierte ich von 1974 bis 1976 an der Universität München Forstwissenschaft, anschließend, von 1977 bis 1982, Tiermedizin.

Im Dezember 1982 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

